

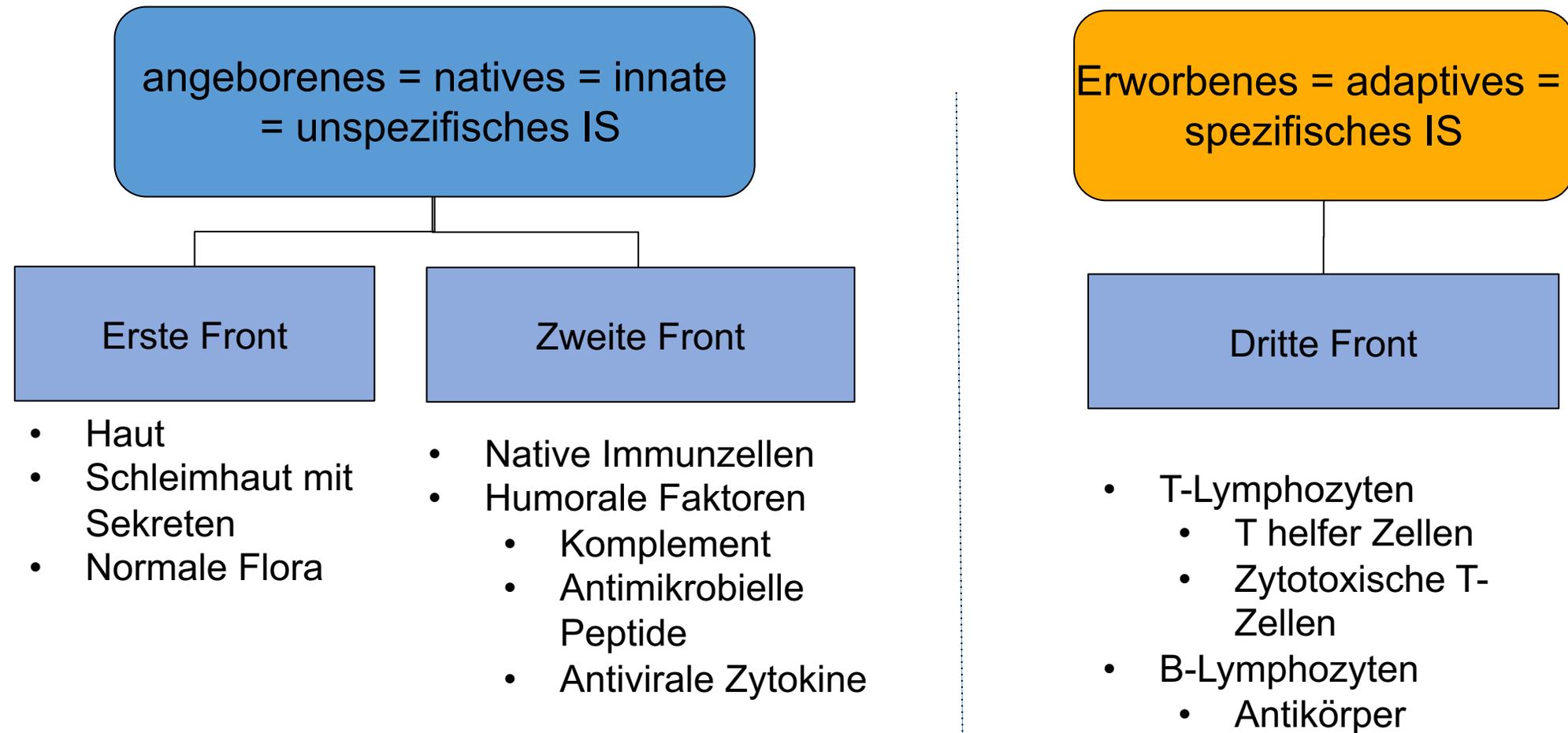
Grundlagen des immunologischen Schutzes beim Schwein und deren Anwendung auf Impfstoffe

Artur Summerfield

Vetsuisse Fakultät Universität Bern

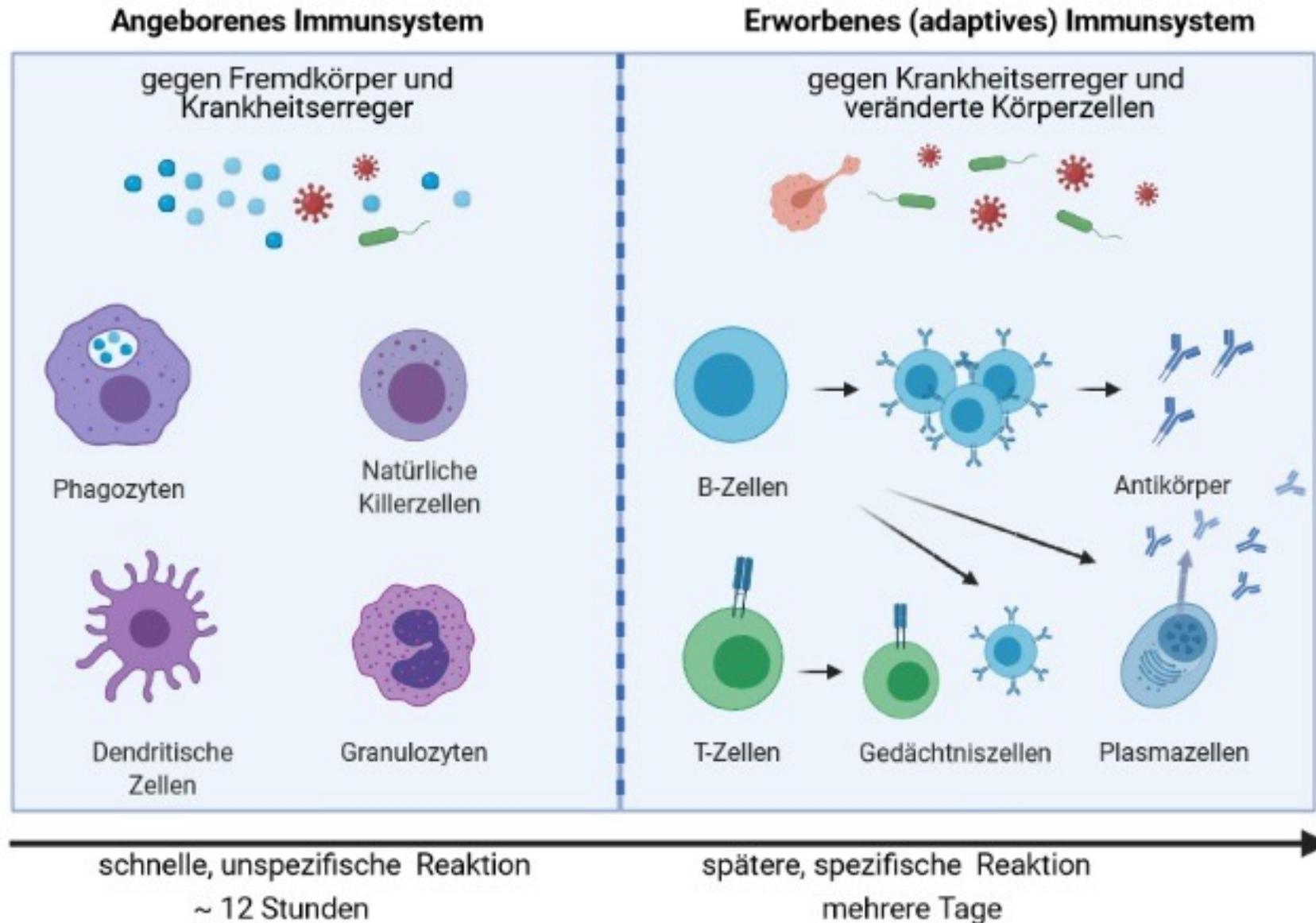
1. Grundlagen des Immunitätsaufbaus gegen Viren und Bakterien
 1. Angeborene Immunität
 2. Erworbene Immunität
 3. Schleimhautimmunität
2. Funktionsweise von antiviralen und antibakteriellen Impfstoffen
3. Intradermale, subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikationen
4. Schlussfolgerungen für die Impfung gegen *Lawsonia Intracellularis*

Übersicht des angeborenen und adaptiven Immunsystems



Übersicht des angeborenen und adaptiven Immunsystems

Wichtige
Komponenten
des
angeborenen
Immunsystem
werden wenig
Stunden nach
einer Infektor
aktiviert.



Die beiden prominenten Antworten des angeborenen Immunsystems sind:

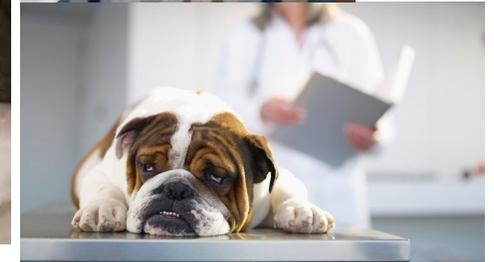
1. Entzündung:

- Leukozyten und Plasmaproteine werden aus der Blutbahn zum Ort der Infektion/Trauma gebracht
- Es kommt zur Aktivierung von bestimmten Leukozyten und Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokine
- Phagozytose von Mikroorganismen

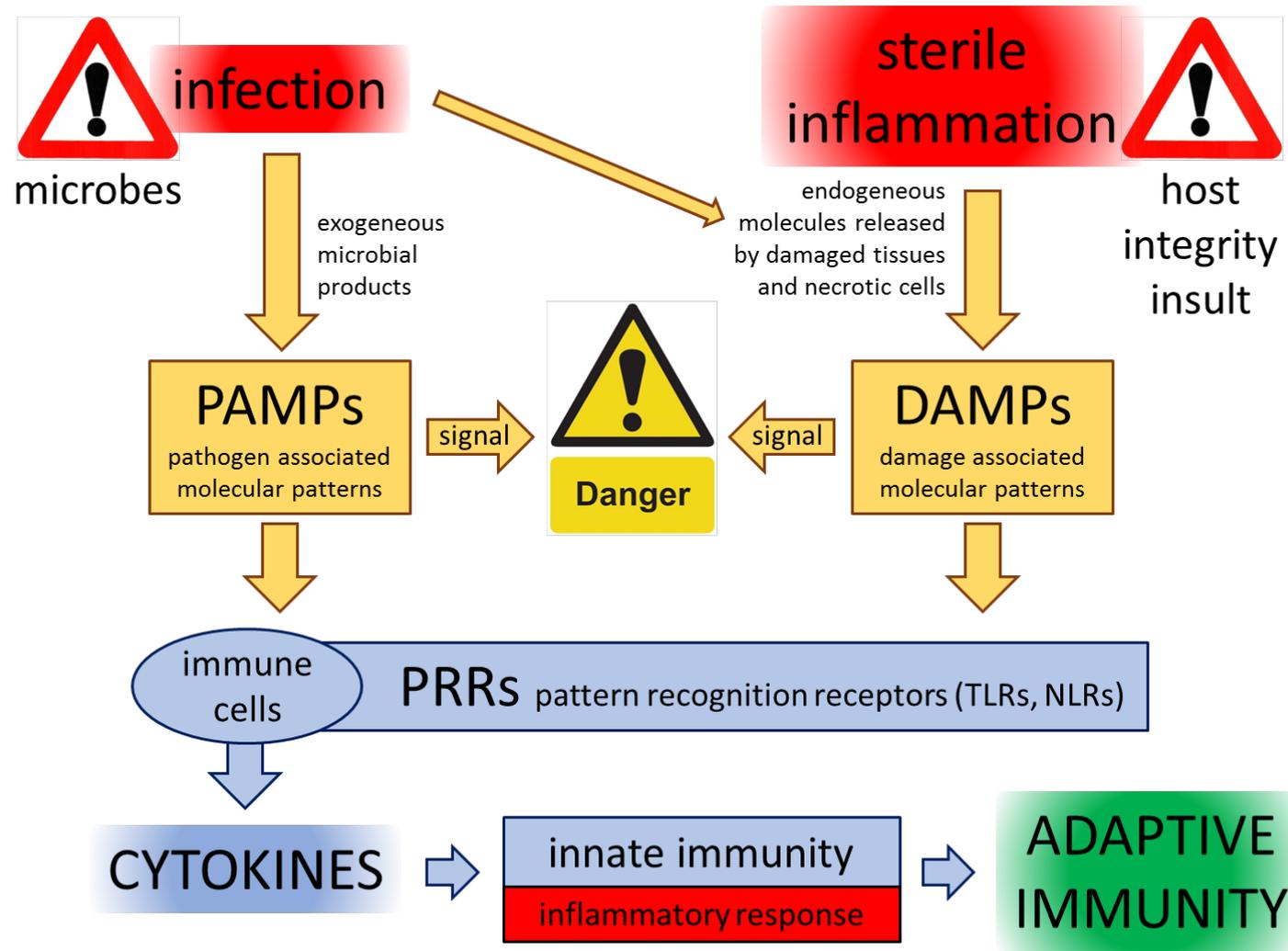


2. Antivirale Antwort:

- Freisetzung von antiviralen Zytokinen wie Interferone

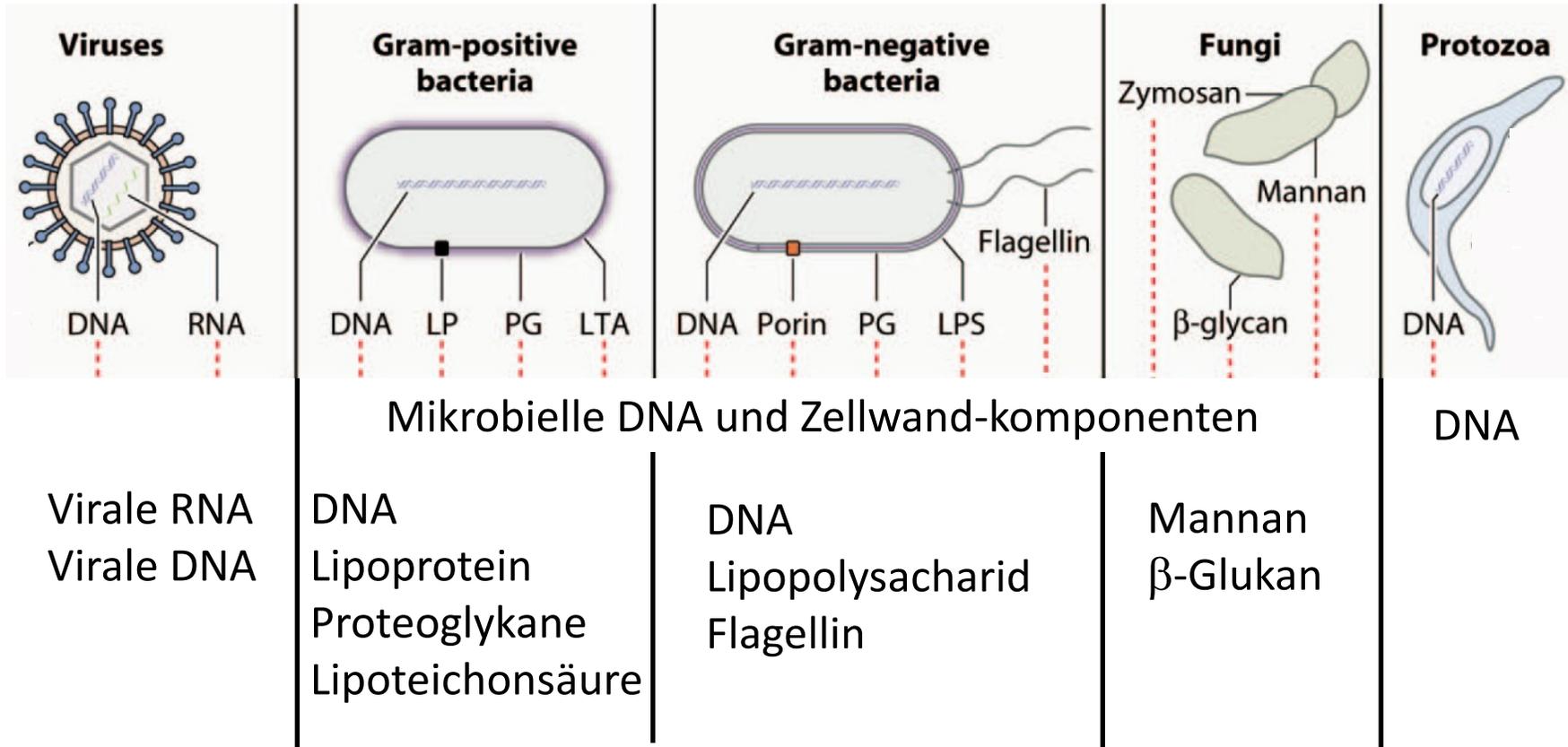


Gefahrensignale sind essenziell für das auslösen einer Immunantwort



Was sind das konkret für Signale und wie werden sie erkannt?

PAMPs = pathogen-associated molecular patterns



--> Typisch sind Strukturen und molekulare Verbindungen, die von Säugetierzellen nicht gebildet werden können.

Sinn: Das angeborene Immunsystem muss «Eindringlinge» sehr schnell erkennen können um darauf reagieren

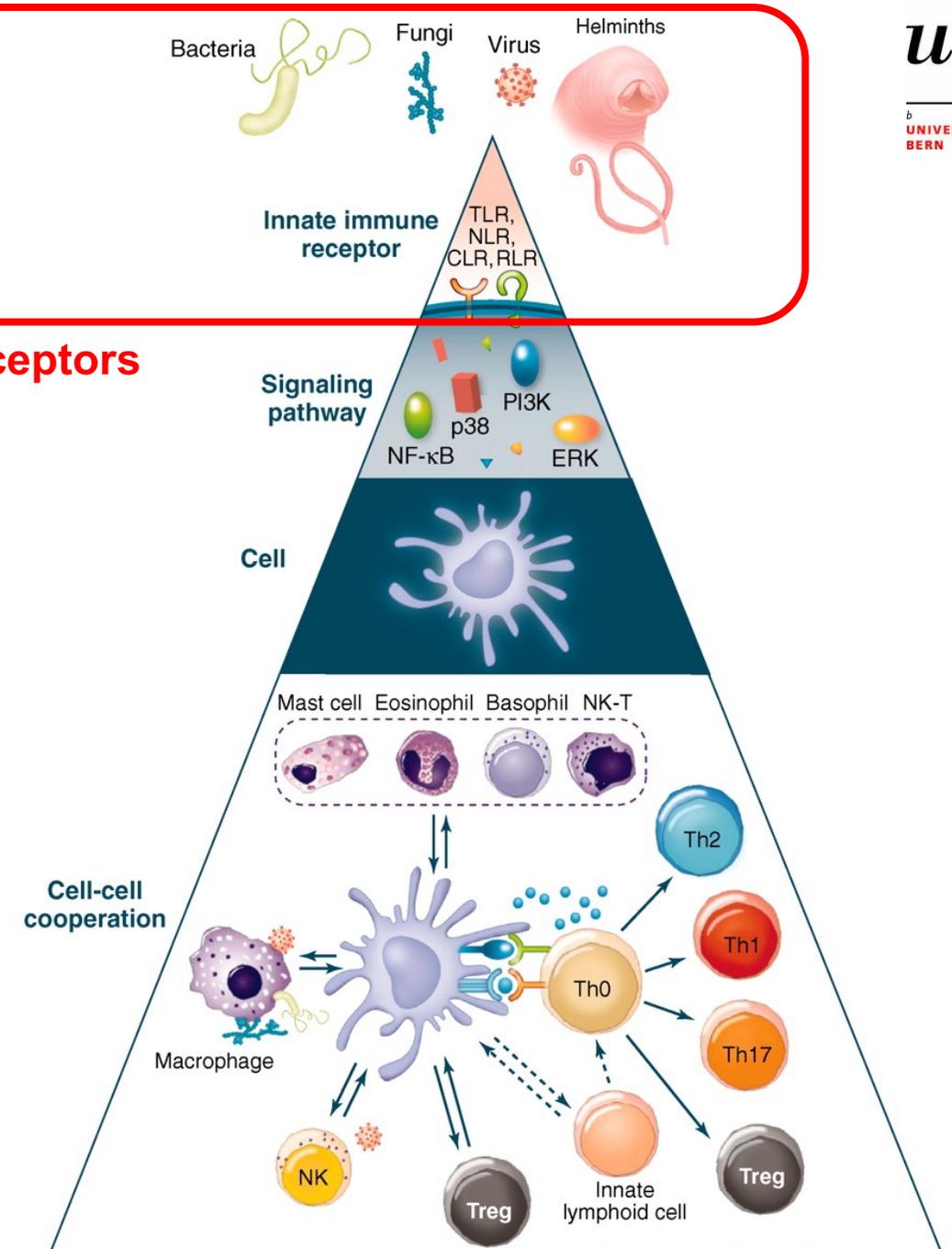
Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

= Mustererkennungsrezeptoren = pathogen recognition receptors (PRR)

→ PRR

- Sind evolutionär hoch konserviert
- erkennen unmittelbar Mikroorganismen um eine sofortige Immunreaktionen hervorzurufen

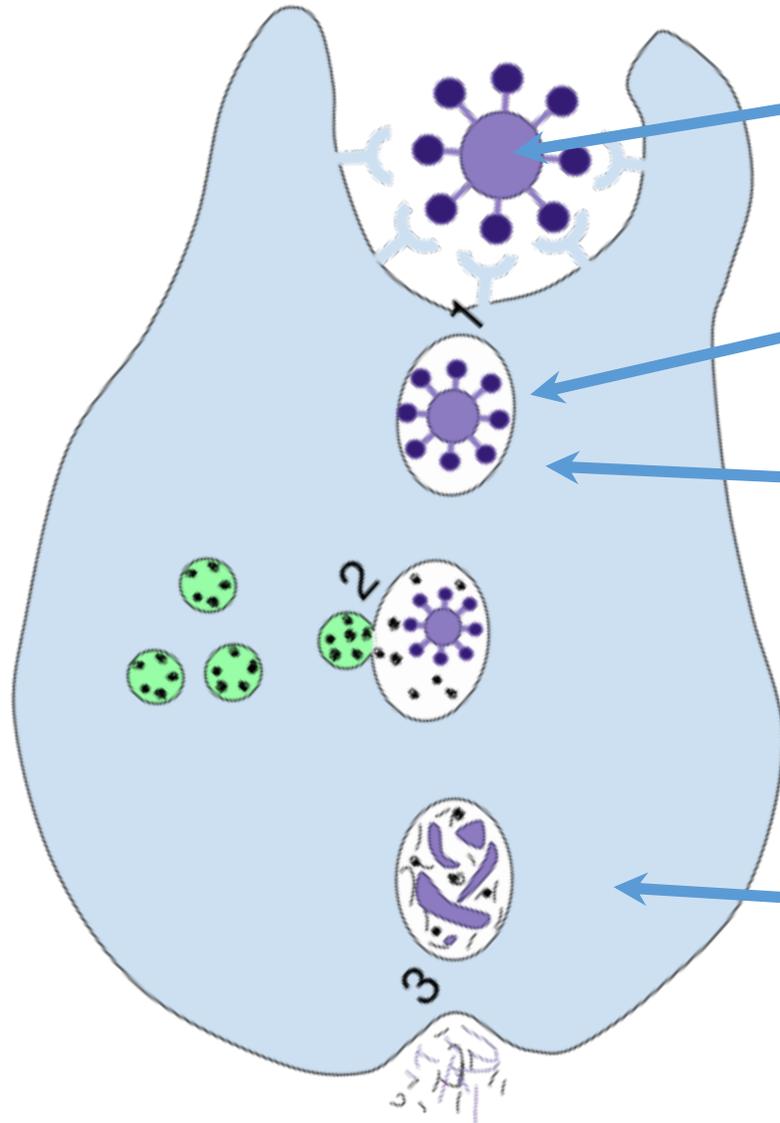
→ Die Bindung von mikrobiellen Strukturen an PRR bewirkt eine Signaltransduktion und Aktivierung der Immunzellen



Unterschiede zwischen Rezeptoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems

	Angeborenen (innate): PRR	Adaptativ: B- und T-Zellrezeptoren
Spezifität	Bedingt spezifisch: für Moleküle von Gruppen bestimmter Mikroben (Muster -> PAMPS)	Hochspezifisch: präzise definierte molekulare Strukturen (Antigene)
Diversität	Limitiert, da nur durch in der Keimbahn kodierte Rezeptoren (erkennen ca. 1000 verschiedene "Muster")	Sehr gross, Rezeptoren entstehen durch somatische Rekombination von Gensegmenten (erkennen 10^{14} - 10^{18} verschiedene Antigene)
Memory/ Adaptation	Nein (bedingt möglich)	Ja
Aktivierung	In Minuten bis Stunden	Mehrere Tage

Phagozytose und Abtöten von Mikroben durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten



1. Bindung der Mikroben (direkt oder nach Opsonierung (siehe später))

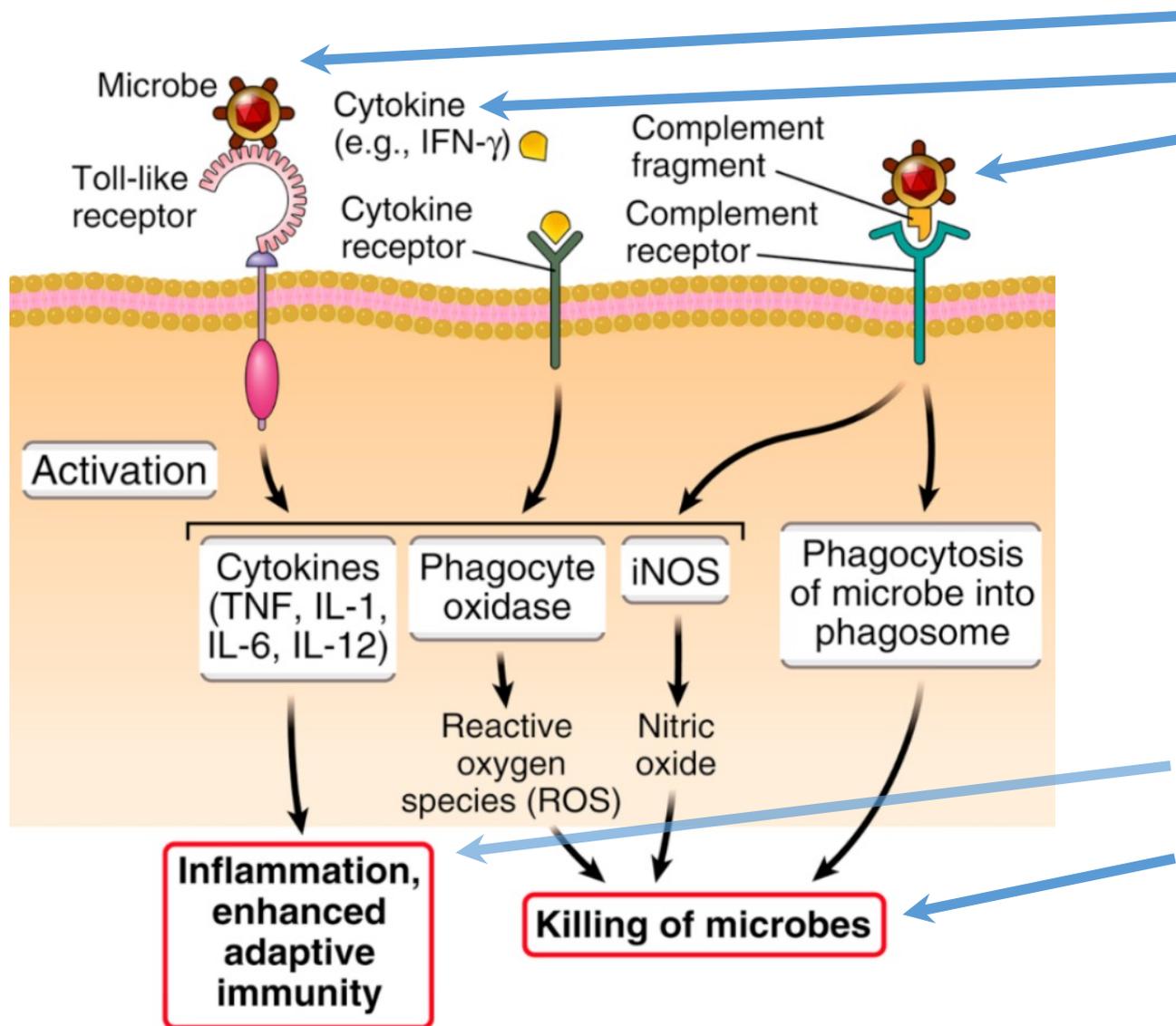
2. Internalisierung

3. Mikrobe ist nun im Phagosom

4. Fusion mit dem Lysosom

5. Abtöten im Phagolysosom durch reaktive Metaboliten und Enzyme

Funktionen des aktivierten Makrophagen

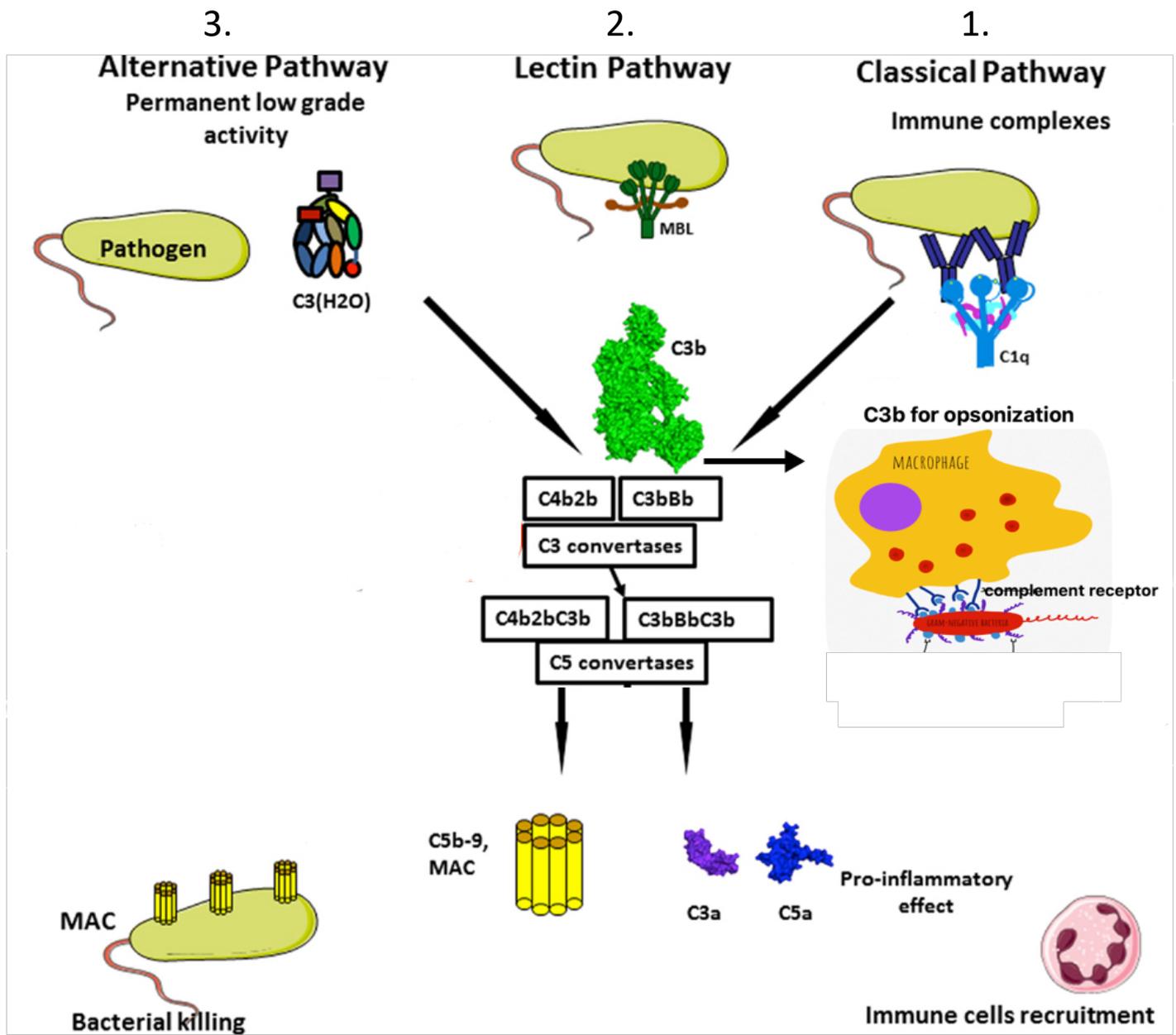


1. Aktivierung:

- PRR vermittelt
- Zytokin-vermittelt
- Komplement-vermittelt

2. Funktionen

- Produktion pro-inflammatorischer Zytokine
- Phagozytose von (opsonierten) Mikroben
- Freisetzung von reaktivem Sauerstoff (ROS) und Stickstoff (NO) → antimikrobielle Wirkung

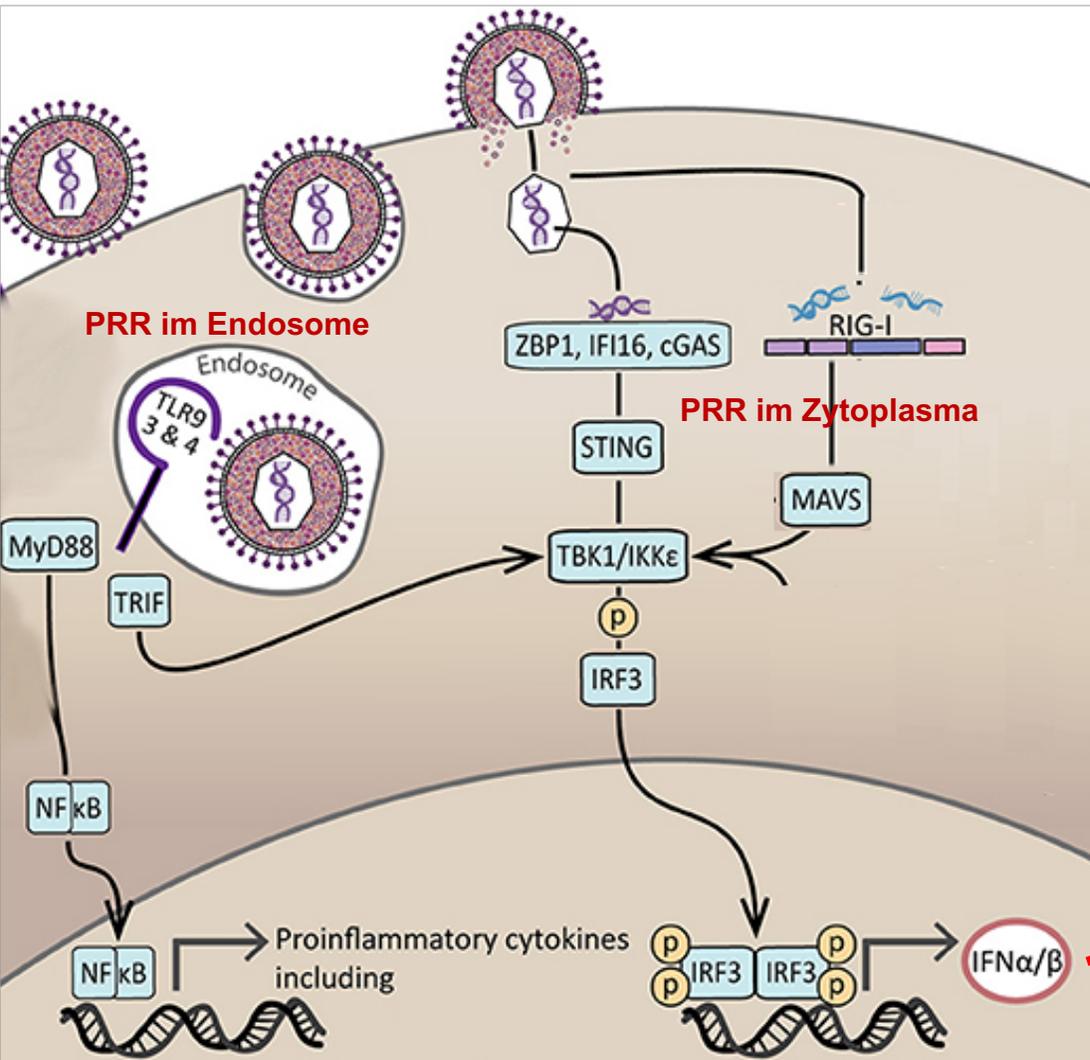


Komplementaktivierung

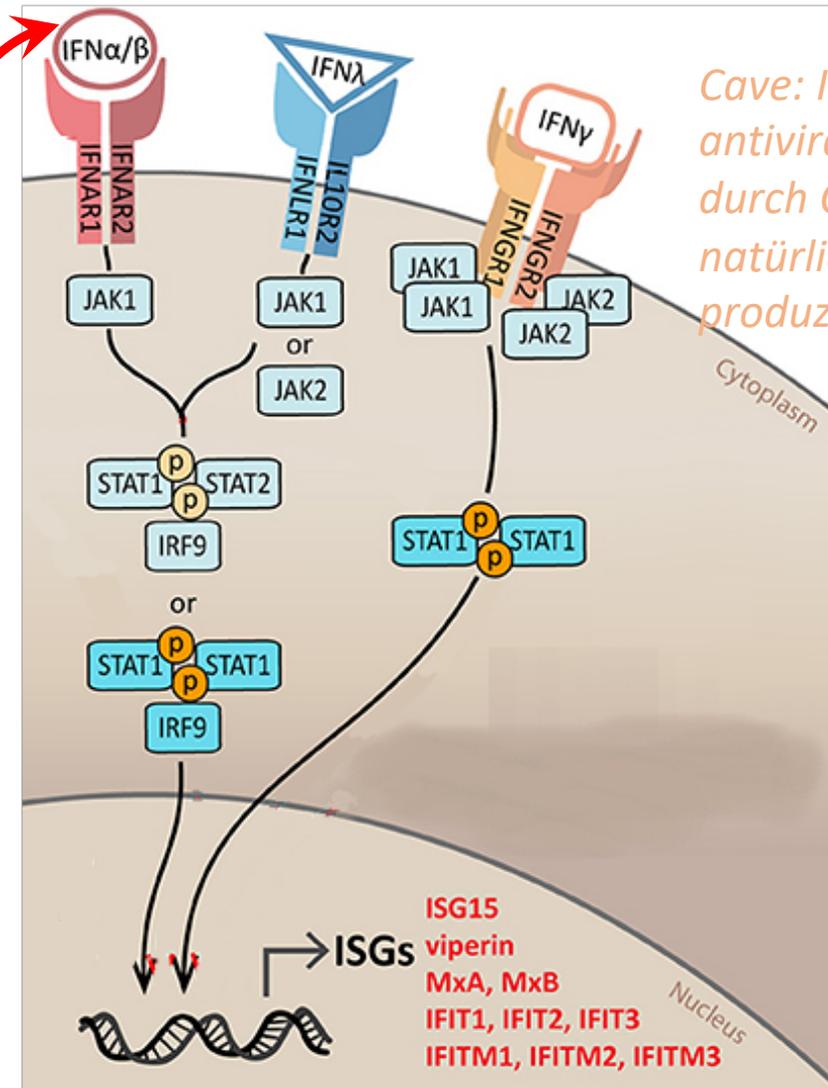
1. Der klassischer Pathway erfordert Antikörper und ist damit v.a. aktiv während der adaptiven Immunantwort
2. Lectin Pathway erfolgt über Mannose binding lectin (MBL). Dies ist ein Plasmaprotein, das Mannose auf der Oberflächen von bestimmten Mikroben bindet und in Folge die Komplementkaskade initiiert.
3. Beim alternativen Pathway erfolgt die Aktivierung durch fehlende Hemmung. Wirtszellen exprimieren Komplementinhibitoren, die auf Bakterien fehlen.

Antivirale Effekte von Interferone

1. Induktion in infizierter Zelle



2. Bindung an Rezeptoren von zahlreichen Zellen im Gewebe

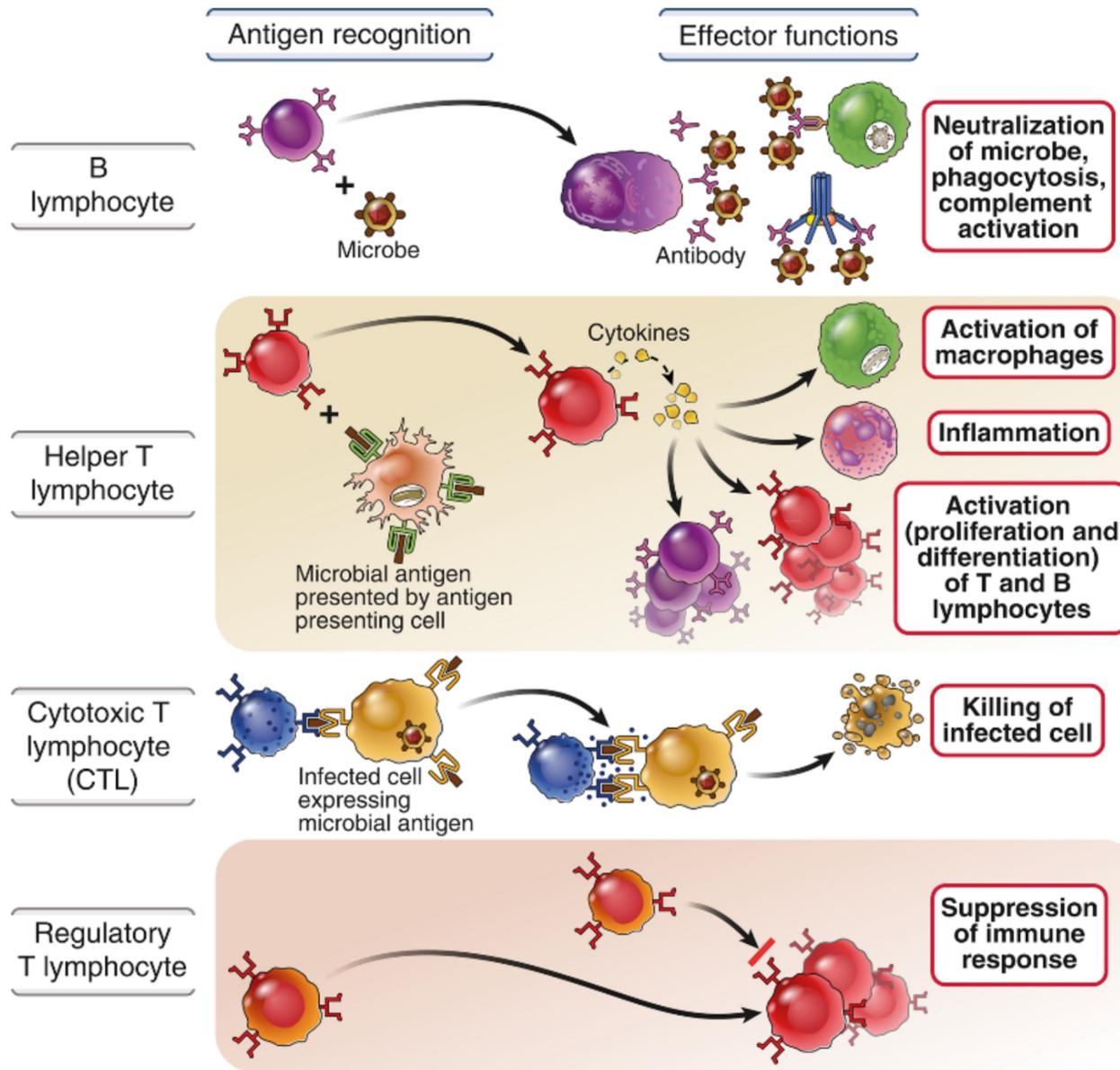


Cave: IFNγ ist zwar antiviral wird aber primär durch CD4+ T-Zellen und natürliche Killer Zellen produziert

3. Induktion von antiviralen Mechanismen

1. Grundlagen des Immunitätsaufbaus gegen Viren und Bakterien
 1. Angeborene Immunität
 2. Erworbene Immunität
 3. Schleimhautimmunität
2. Funktionsweise von antiviralen und antibakteriellen Impfstoffen
3. Intradermale, subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikation
4. Schlussfolgerungen für die *Lawsonia intracellularis* intradermale Impfung

Hauptfunktionen der adaptiven Immunantwort



1. B-Zellen und Antikörper:

➤ Neutralisation, Opsonierung, Komplementaktivierung

2. Helfer T-Zellen (CD4)

➤ Makrophagenaktivierung, Entzündung, Aktivierung von B-Zellen

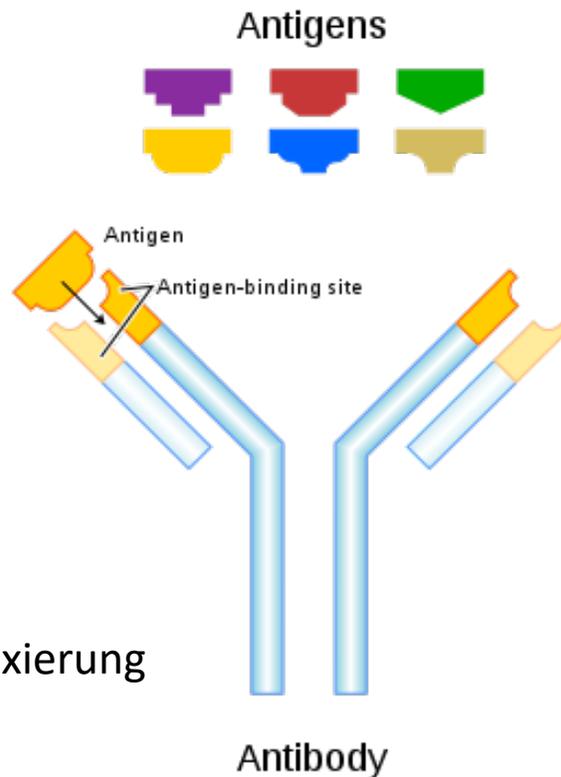
3. Zytotoxische T-Zellen (CD8)

➤ Lyse infizierter Zellen

4. Regulatorische T-Zellen

➤ Suppression der Immunantwort, antiinflammatorisch

Antigene, B- und T-Zellrezeptoren

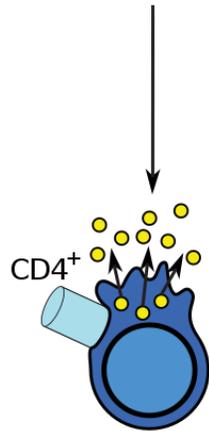
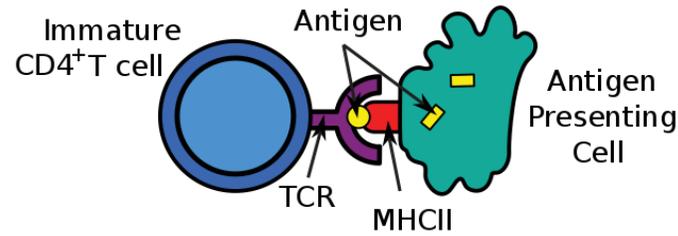


Fc Teil: vermittelt
Effektorfunktion:

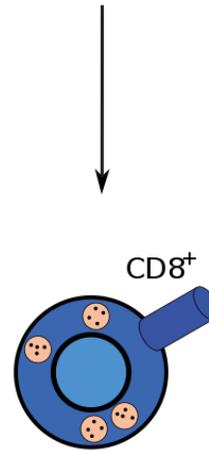
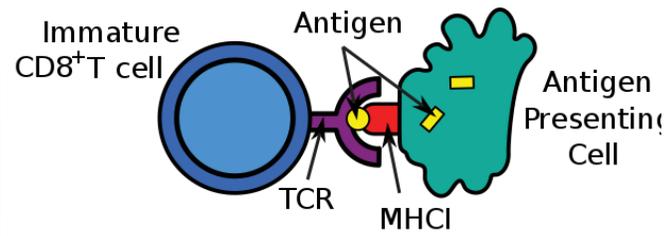
- Komplementfixierung
- Opsonierung

- **Antigene** sind Substanzen, welche von Antigen-Rezeptoren auf T- und B-Zellen „gesehen“ werden.
- **Antigenrezeptoren auf B-Zellen („B-Zell-Rezeptor“)** sind membranständige Antikörper. Sie erkennen typischerweise Makromoleküle, wie Proteine, Polysaccharide, Lipide, Nukleinsäure und andere **ohne** vorherige Prozessierung durch Antigen-präsentierende Zellen

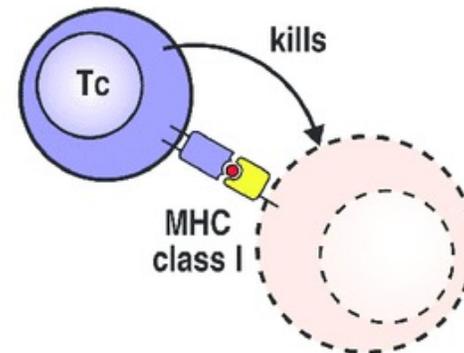
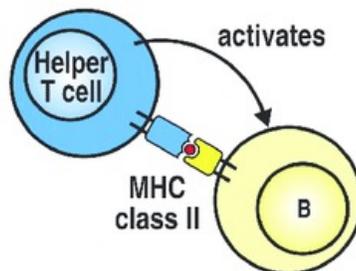
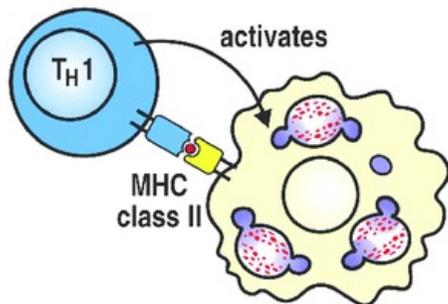
Antigene, B- und T-Zellrezeptoren



Mature helper
T cell
(Th1 or Th2)



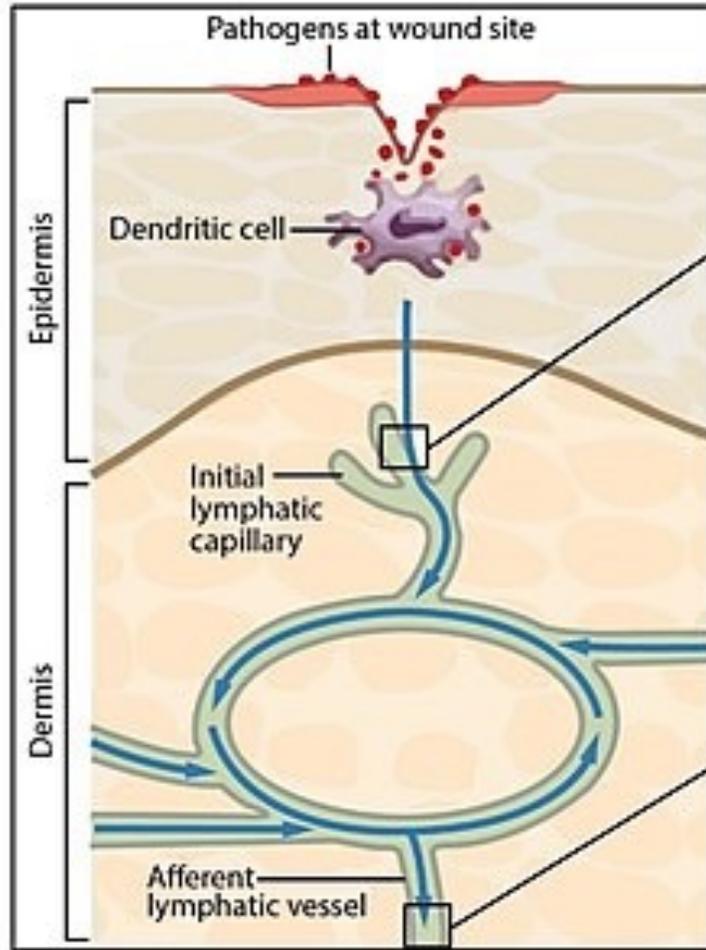
Mature cytotoxic
T Cell
(Tc)



- **Antigen-rezeptoren auf T-Zellen („T-Zell-Rezeptor“)** erkennen nur in **Peptide**, die von Antigen-präsentierender Zellen (APC) präsentiert werden.
- Es gibt zwei Haupttypen von T-Zellen: CD4 und CD8 T-Zellen

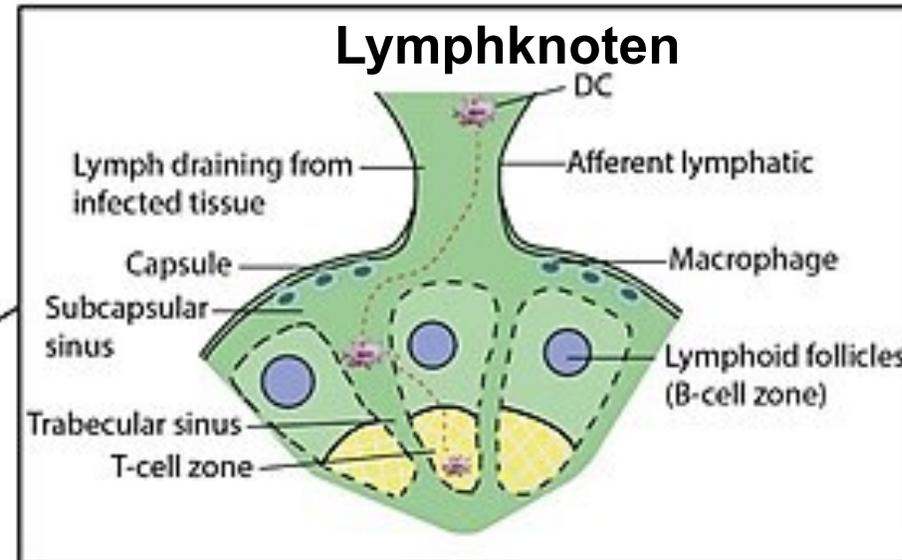
Antigenpräsentation

Haut/Schleimhaut



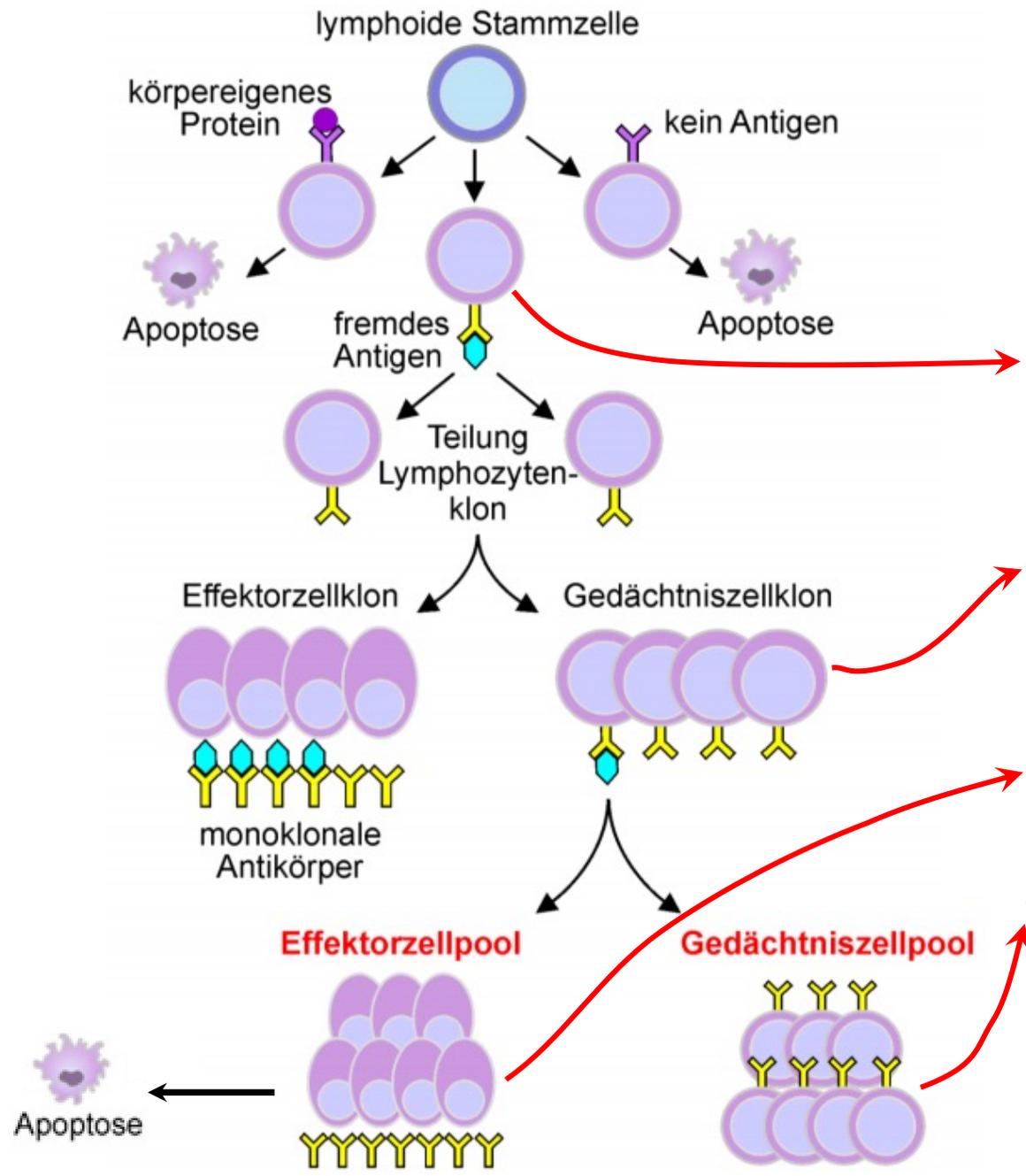
Lymphgefäße

Dendritische Zellen (DC) sind «professionelle» Antigen-präsentierende Zellen, die essenziell sind für die Induktion einer naiven T-Zell-Antwort. Nach Aufnahme von Pathogen oder Bruchstücke davon migrieren sie über die Lymphe in den Lymphknoten.

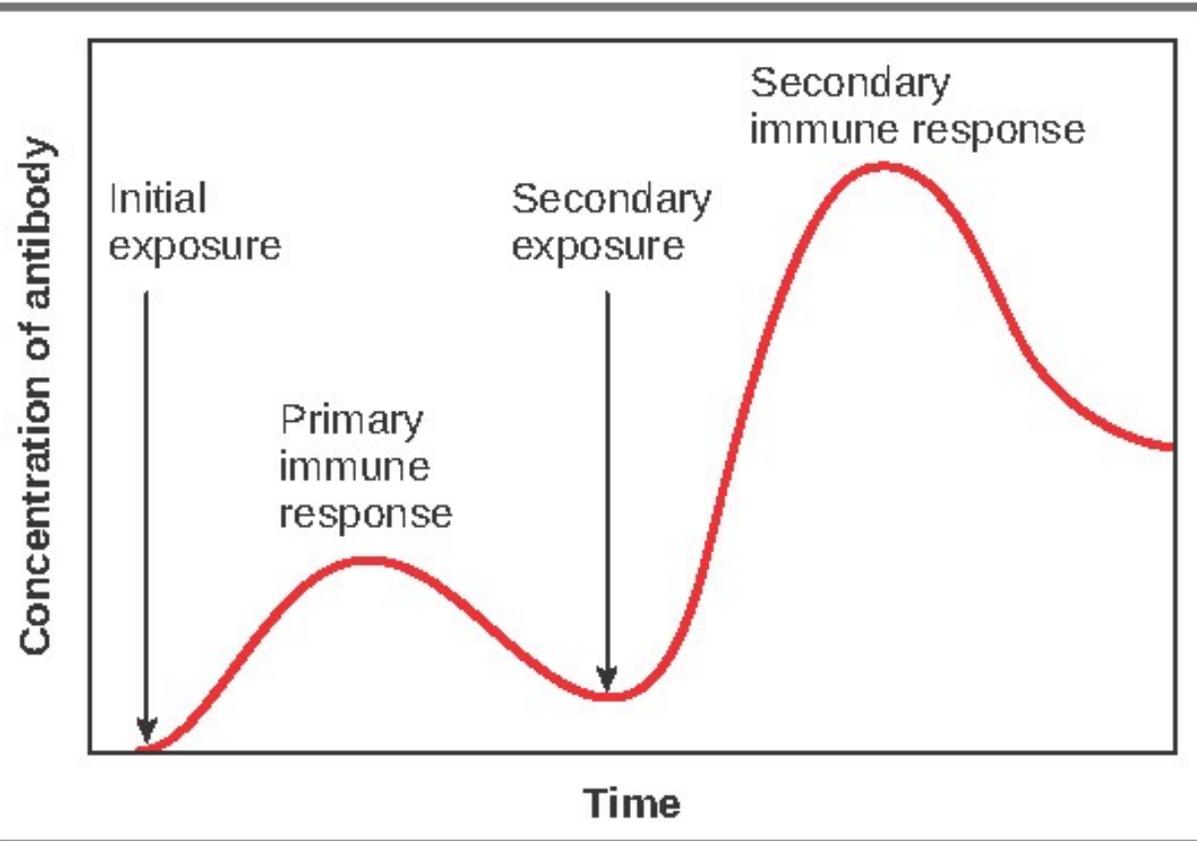


Im Lymphknoten präsentieren DC den T-Zellen das Antigen.

Vier Funktionszustände von B- und T-Lymphozyten



- Naive Lymphozyten (Ursprungszellen des Klons)
- Proliferierende Lymphozyten (klonale Expansion)
- Effektorzellen
- Memory- (Gedächtnis-) Zellen



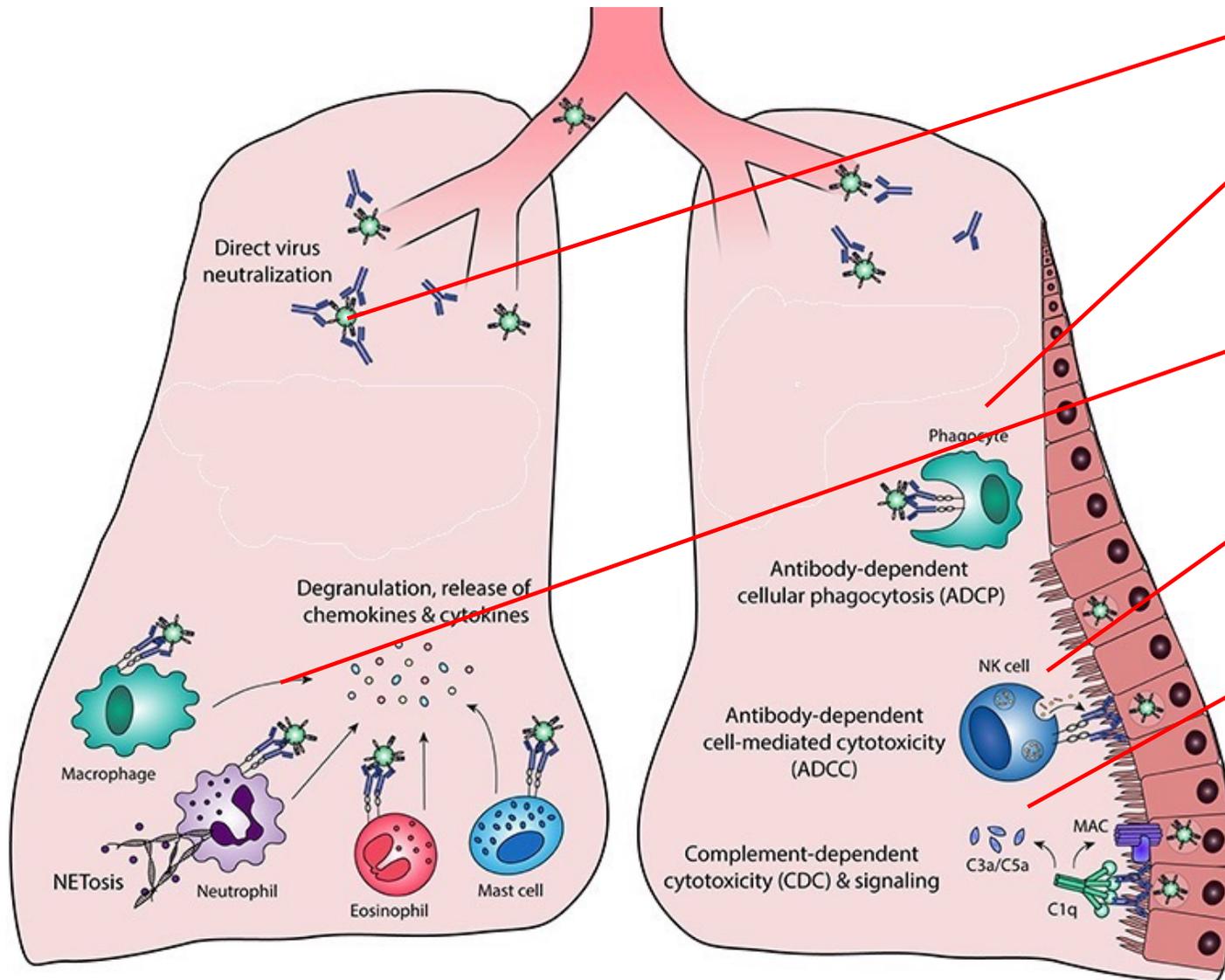
Primärantwort (1-4 Wochen)

1. Aktivierung der naiven B-Zelle
2. Differenzierung in Plasmazelle
3. Differenzierung in Memory-B-Zelle

Sekundärantwort nach erneuten Antigenstimulation:

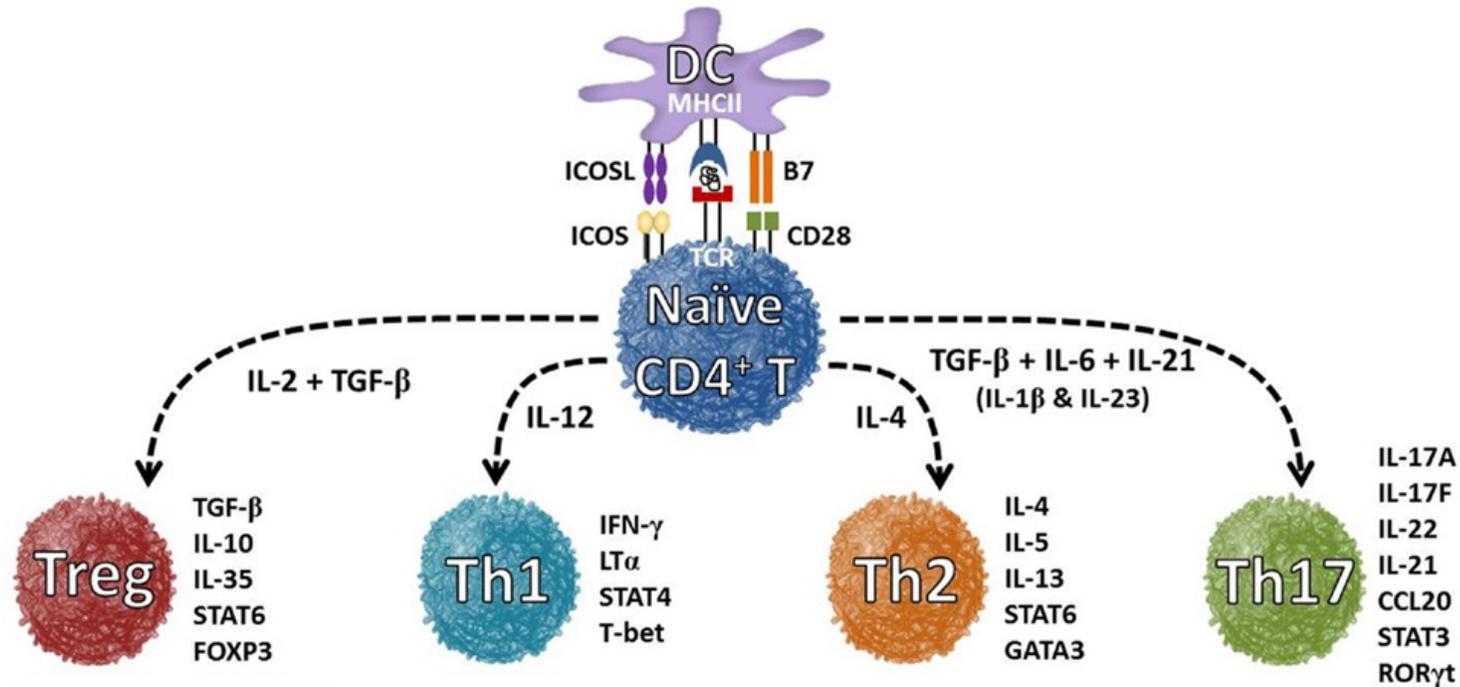
4. Wesentlich raschere und intensivere Entstehung von Plasmazellen durch Aktivierung von Memory B-Zellen

Funktionen von Antikörpern



1. Neutralisation, Infektionshemmung
2. Opsonierung zur Förderung der Phagozytose durch Granulozyten und Makrophagen
3. Opsonierung zur Aktivierung Granulozyten und Makrophagen
3. Aktivierung von Natürlichen Killer Zellen
4. Komplementaktivierung
direkte Lyse
Opsonierung
Entzündung

Was sie über die 3 Helfer T-Zell Typen wissen sollten



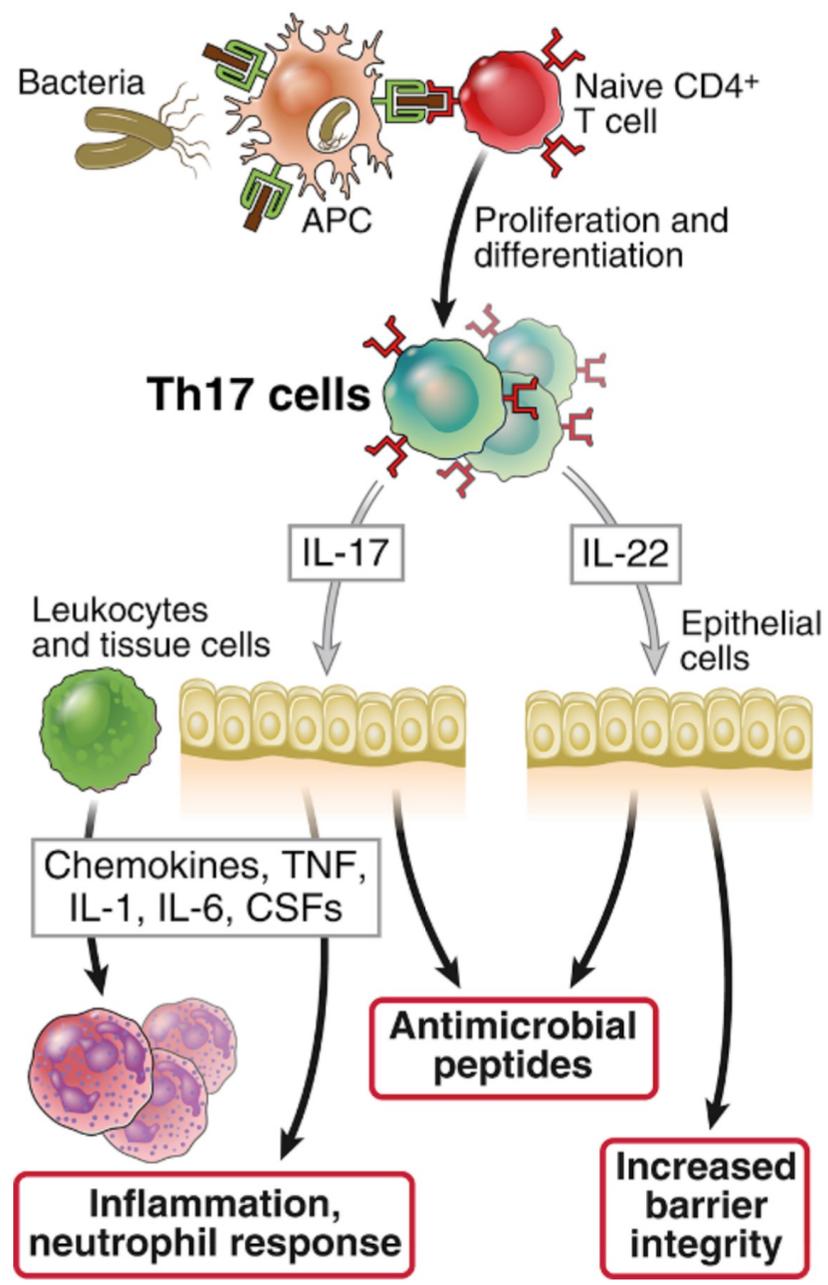
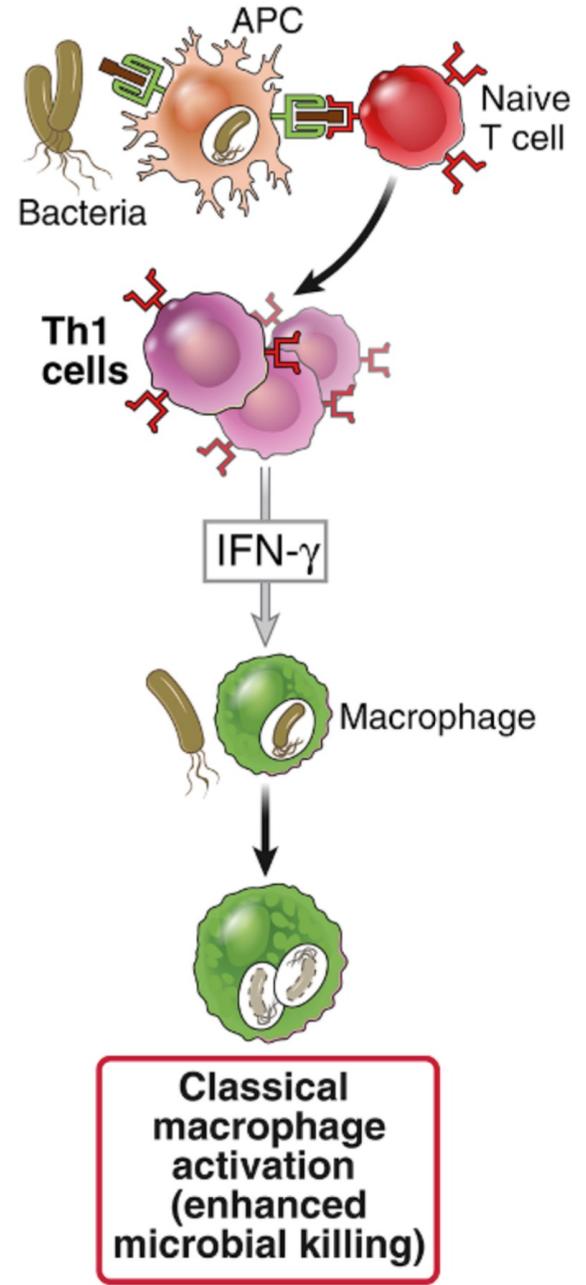
Regulatorische T-Zelle
Immunregulation,
Homöostase

Th1-Zelle
Viren und
intrazelluläre
Bakterien wie
Lawsonia, Listerien,
Mykobakterien

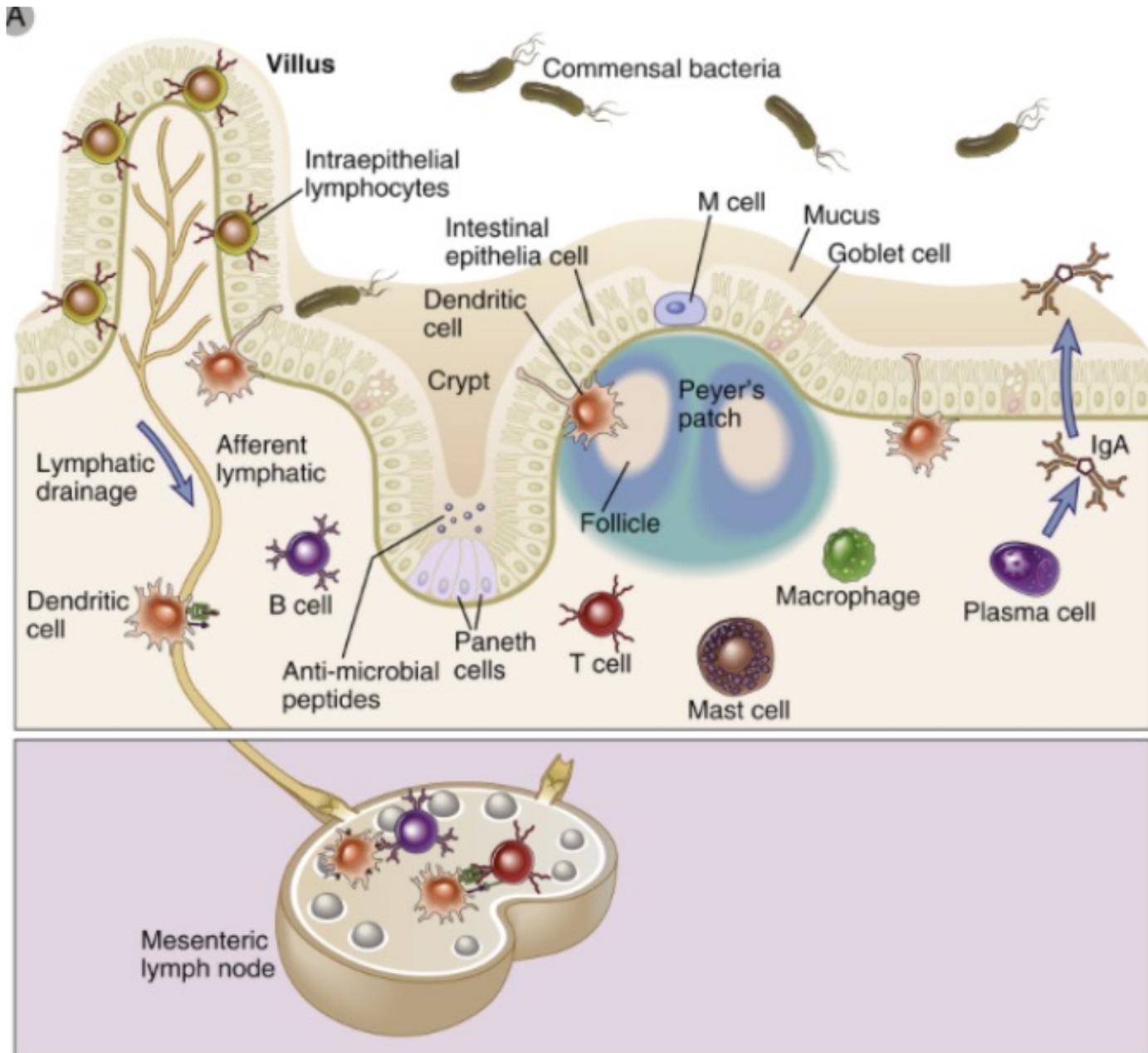
Th2-Zelle
Würmer

Th17-Zelle
Extrazelluläre
Bakterien wie E.
coli,
Staphylokokken,
Pilze

Grundlagen der antibakteriellen Wirkung der Th1 und Th17 Antwort



1. Grundlagen des Immunitätsaufbaus gegen Viren und Bakterien
 1. Angeborene Immunität
 2. Erworbene Immunität
 3. Schleimhautimmunität
2. Funktionsweise von antiviralen und antibakteriellen Impfstoffen
3. Intradermale, subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikation
4. Lawsonia intracellularis Impfung

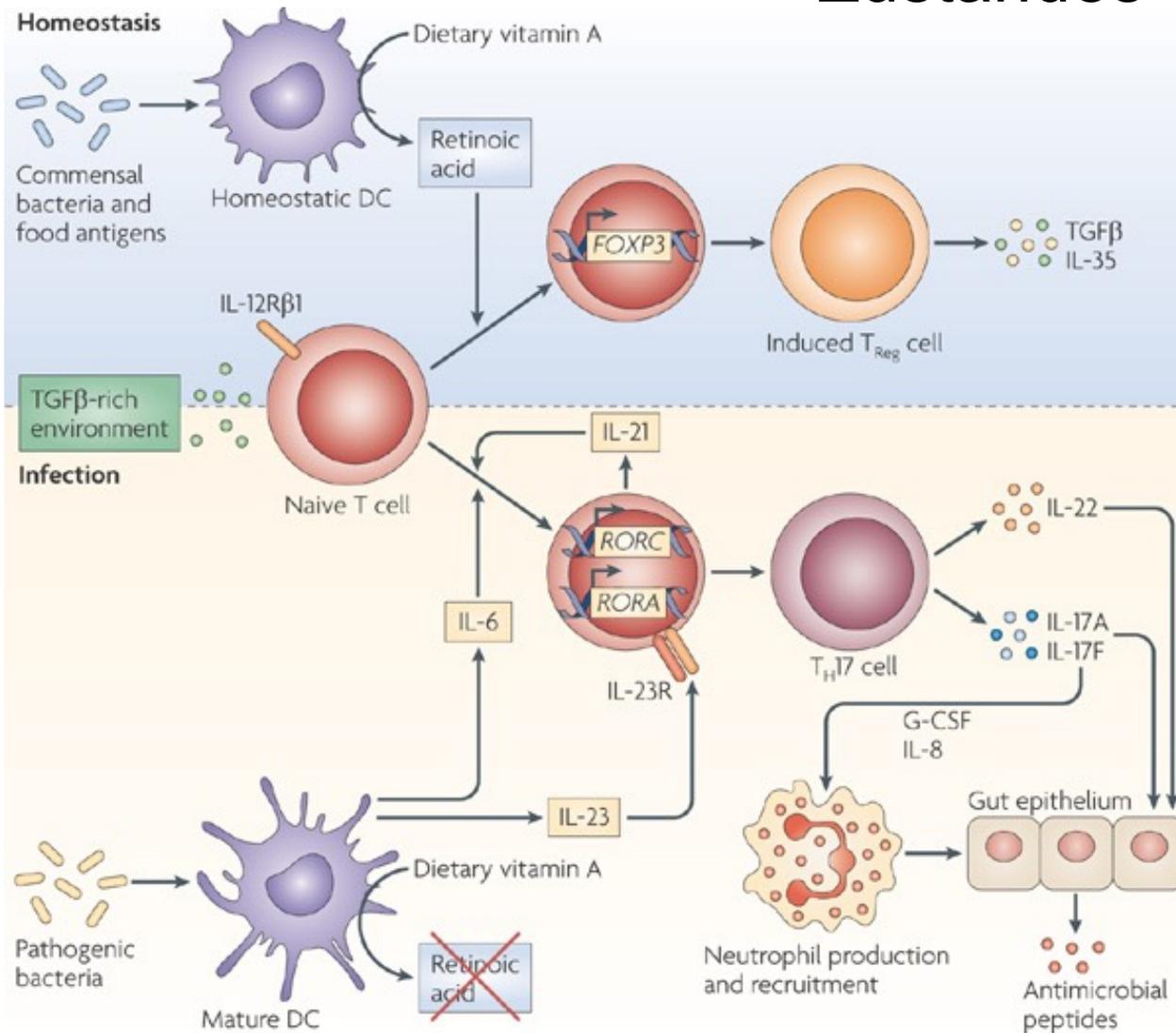


- Hauptkomponenten:
1. Ganz wichtig:
sekretorisches IgA
 2. Schleimbarriere
 3. Epithelzellbarriere
 4. Antimikrobielle
Peptide
 5. Mikrobiom
 6. Besonderes
immunologisches
“Milieu”

Komponenten der Schleimhautoberfläche

- 200m² Oberfläche
- Intestinale Mikrobiome: 500 verschiedene Species, 10¹⁴ Zellen, wichtigste Eintrittspforte für Infektionserreger
- „Wir sind 10% Mensch, 90% Bakterien“
 - Mikrobiom besetzt Nischen und verhindert die Kolonisierung mit pathogenen Mikroorganismen
 - Fördert die Entwicklung der schützenden Funktionen der Schleimhaut, wie die Schleimbildung, die Sekretion antimikrobieller Peptide, die Integrität der Epithelzellbarriere
- Muzine: stark glykosylierte Proteine bilden eine zähflüssige Schicht welche das Eindringen von Pathogenen verhindern kann.

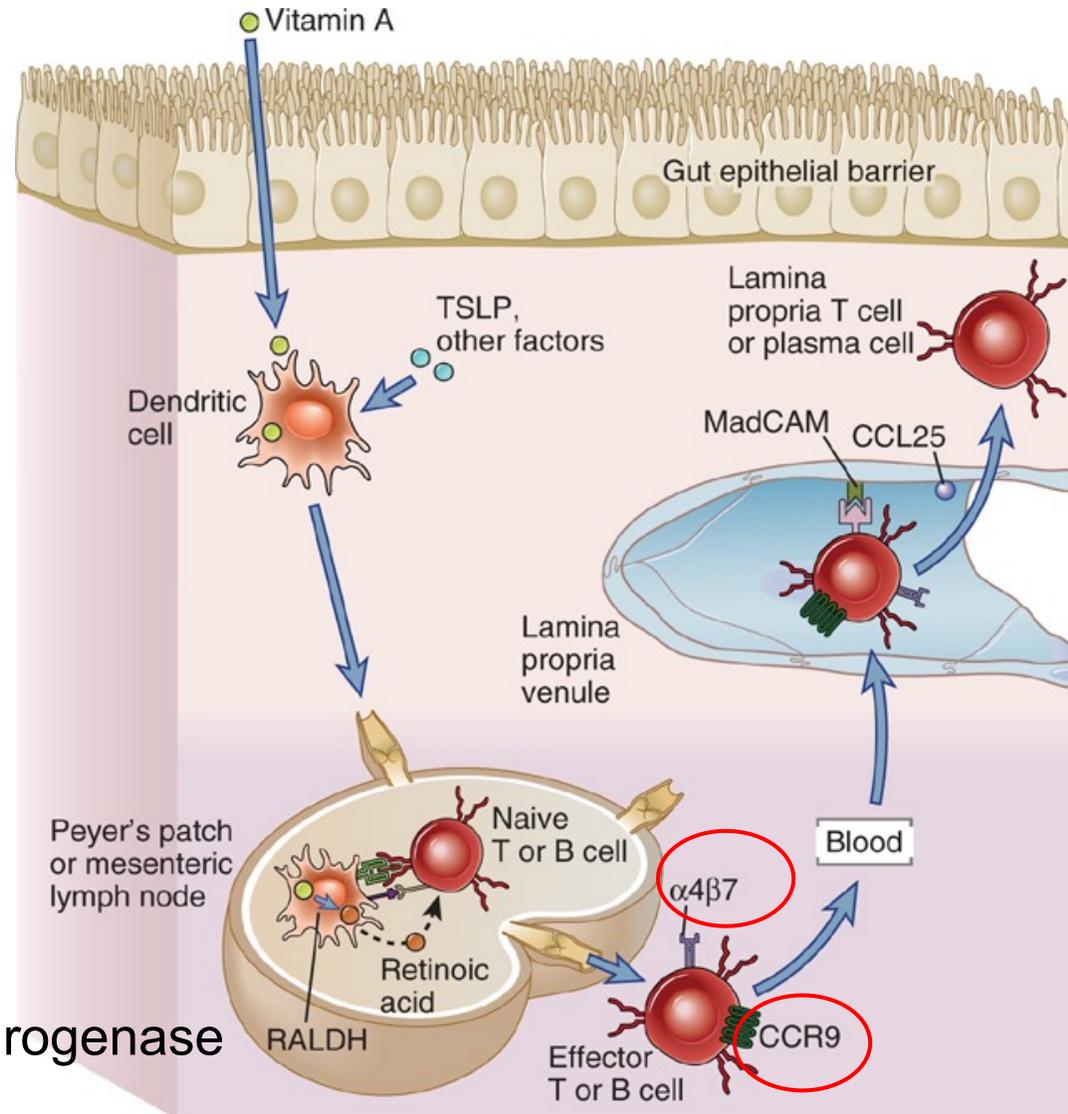
Regulation eines tolerogenen versus eines antimikrobiellen Zustandes



Vitamin A bzw. Retinsäure fördern die Generierung von regulatorischen T Zellen (und IgA switch)
-> gesunder Darm in Homöostase

Invasive Bakterien hemmen Retinsäurebildung und fördern die Th17 Immunantwort
-> entzündlicher, antibakterieller Darm

Kompartimentalisierung des mukosalen Immunsystems durch Induktion von Darm-spezifischen „Homing“ Rezeptoren



Pathogen-spezifische sekretorischer IgA's und zellulärer Immunantwort



Lokale Immunantwort im mesenterische Lymphknoten notwendig!

Retinaldehyhydrogenase

1. Grundlagen des Immunitätsaufbaus gegen Viren und Bakterien
 1. Angeborene Immunität
 2. Erworbene Immunität
 3. Schleimhautimmunität
2. Funktionsweise von antiviralen und antibakteriellen Impfstoffen
3. Intradermale, subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikation
4. Schlussfolgerungen für die *Lawsonia intracellularis* intradermale Impfung

Wünschenswerte Eigenschaften von antiviralen Impfstoffe (im allgemeinen, nicht für alle Viren gültig)

T-Zell vermittelte Immunität	wie	Impfstoffart
Aktivierung einer starken Th1 Immunantwort	<ul style="list-style-type: none">• Starkes Adjuvanz• Stimulation von Interferonsystem	<ul style="list-style-type: none">• alle
Aktivierung von zytotoxische T-Zellen (CD8)	<ul style="list-style-type: none">• Zytoplasmatische Antigenprozessierung• Stimulation von Interferonsystem	<ul style="list-style-type: none">• Lebendimpfstoffe• Vektorimpfstoffe• RNA Impfstoffe
Lokale Immunität (residente Memoryzellen)	<ul style="list-style-type: none">• Lokale Impfstoffapplikation	<ul style="list-style-type: none">• Lebendimpfstoffe

Wünschenswerte Eigenschaften von antiviralen Impfstoffe (im allgemeinen, nicht für alle Viren gültig)

Antikörper-vermittelte Immunität	wie	Impfstoffart
Induktion neutralisierender Antikörper	<ul style="list-style-type: none">• Starkes Adjuvanz• Korrektes Antigen	<ul style="list-style-type: none">• alle
Induktion von Antikörper mit anderen Funktionen (meist Fc Rezeptor vermittelt)	<ul style="list-style-type: none">• Starkes Adjuvanz• Korrektes Antigen	<ul style="list-style-type: none">• alle
Lokale Immunität (IgA und residente Memoryzellen)	<ul style="list-style-type: none">• Lokale Impfstoffapplikation	<ul style="list-style-type: none">• Lebendimpfstoffe

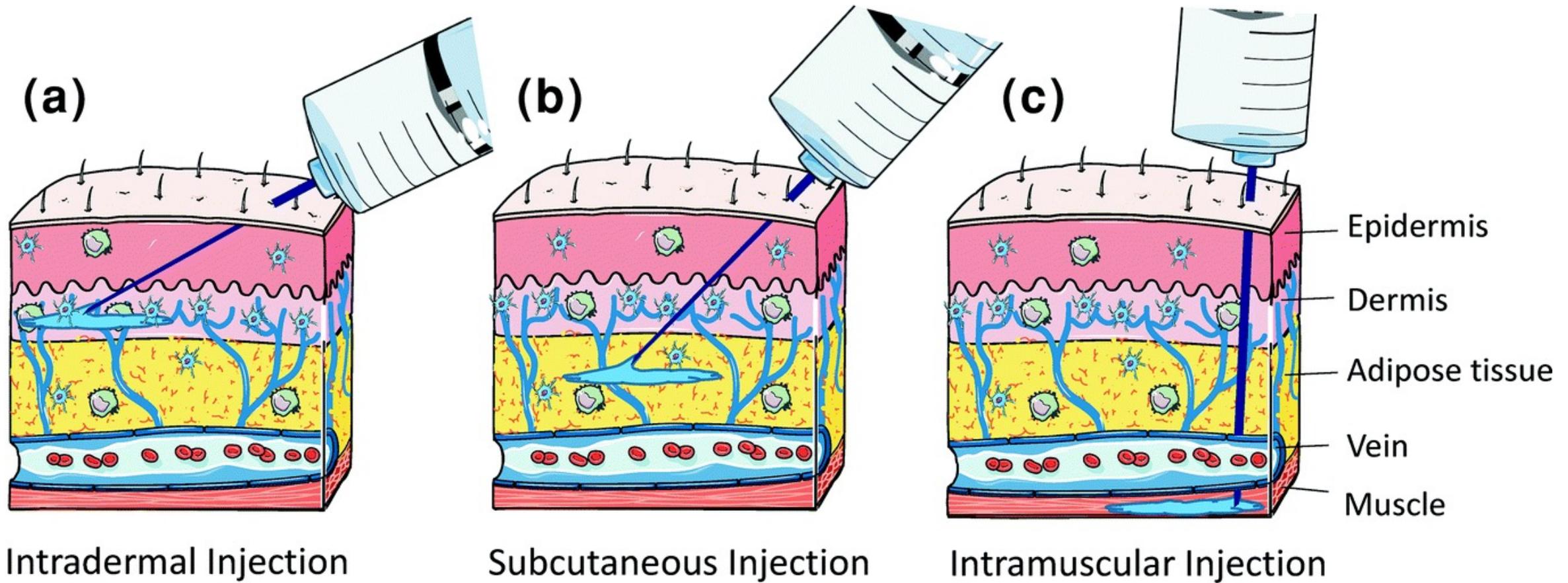
Wünschenswerte Eigenschaften von antibakteriellen Impfstoffe (im allgemeinen)

T-Zell vermittelte Immunität	wie	Impfstoffart
Extrazelluläre Bakterien: Aktivierung einer starken Th17 Immunantwort	<ul style="list-style-type: none"> • Starkes Adjuvanz • Gezielte Stimulation einer bestimmten Entzündungsreaktion 	<ul style="list-style-type: none"> • alle
Intrazelluläre Bakterien: Aktivierung einer starken Th1 Immunantwort	<ul style="list-style-type: none"> • Starkes Adjuvanz • Stimulation des Interferonsystems 	<ul style="list-style-type: none"> • alle
Lokale Immunität (residente Memoryzellen)	<ul style="list-style-type: none"> • Lokale Impfstoffapplikation 	<ul style="list-style-type: none"> • Lebendimpfstoffe

Wünschenswerte Eigenschaften von antibakteriellen Impfstoffe (im allgemeinen)

Antikörper-vermittelte Immunität	wie	Impfstoffart
Induktion neutralisierender/inhibitorischer Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • Starkes Adjuvanz • Korrektes Antigen 	<ul style="list-style-type: none"> • alle
Induktion von opsonierende Antikörper -> Phagozytose-fördernd	<ul style="list-style-type: none"> • Starkes Adjuvanz • Korrektes Antigen 	<ul style="list-style-type: none"> • alle
Induktion von Komplement-bindender Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • Starkes Adjuvanz • Korrektes Antigen 	<ul style="list-style-type: none"> • alle
Lokale Immunität (IgA und residente Memoryzellen)	<ul style="list-style-type: none"> • Lokale Impfstoffapplikation 	<ul style="list-style-type: none"> • Lebendimpfstoffe

1. Grundlagen des Immunitätsaufbaus gegen Viren und Bakterien
 1. Angeborene Immunität
 2. Erworbene Immunität
 3. Schleimhautimmunität
2. Funktionsweise von antiviralen und antibakteriellen Impfstoffen
3. Intradermale, subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikation
4. Schlussfolgerungen für die *Lawsonia intracellularis* intradermale Impfung



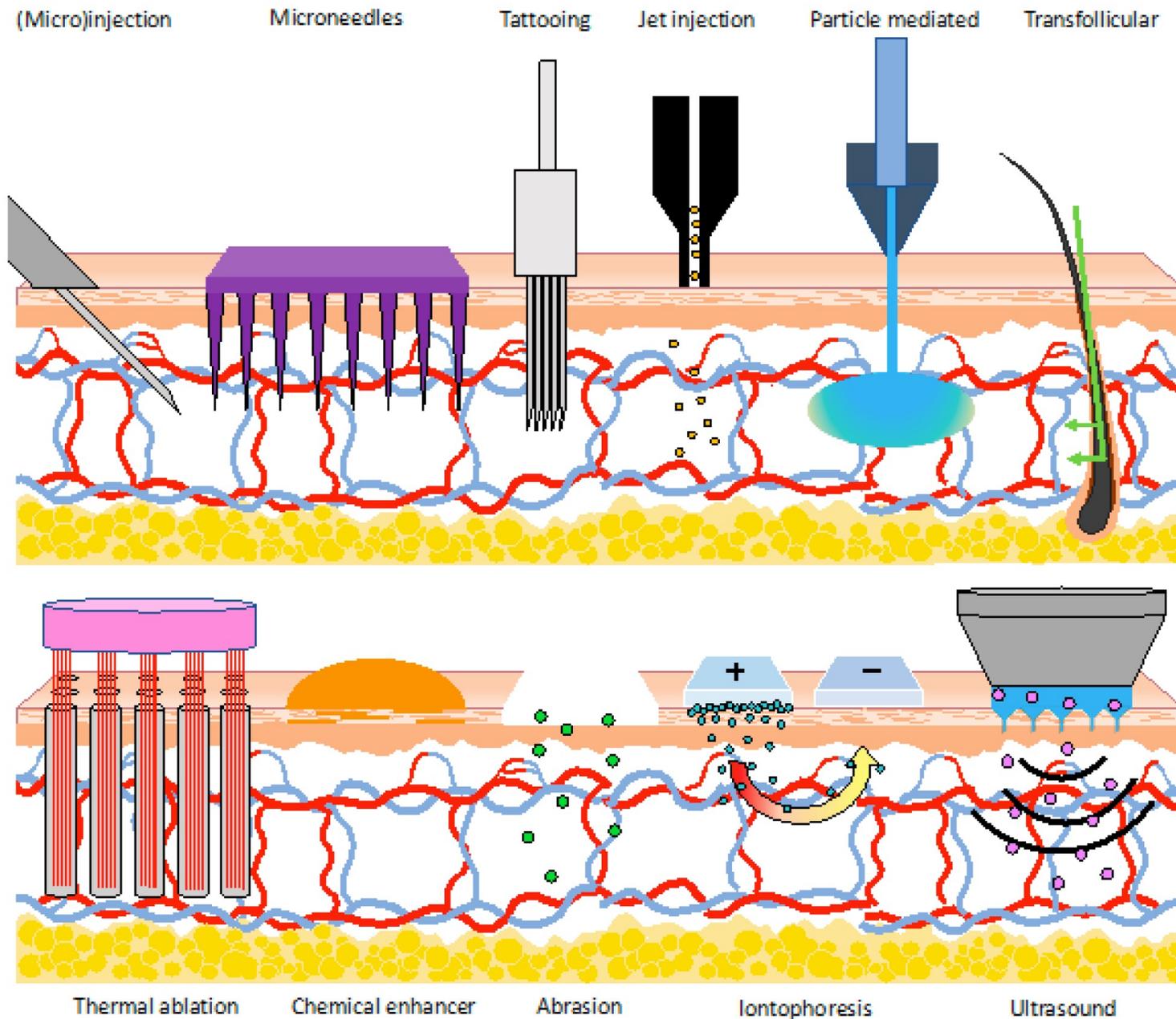
Zeng et al., Current Topics in Microbiology and Immunology
https://doi.org/10.1007/82_2020_217

Vorteile der intradermalen Impfung

1. Hohe Immunogenität, mindestens so gut wie i.m.
2. Eventuell verbesserte Induktion zellulärer Immunität
3. Niedrigere Antigendosen verglichen mit i.m. oder s.c. (20-80%)
4. Erhöhte Sicherheit: keine Gefahr mehr durch Nadeln, kein Transfer von Infektionserregern,
5. Keine Schädigung der Tierkörper
6. Gut geeignet für Massenimpfung
7. Gute Lymphdrainage und dadurch reduziertes Risiko, dass Impfstoffkomponente ins Blut geraten

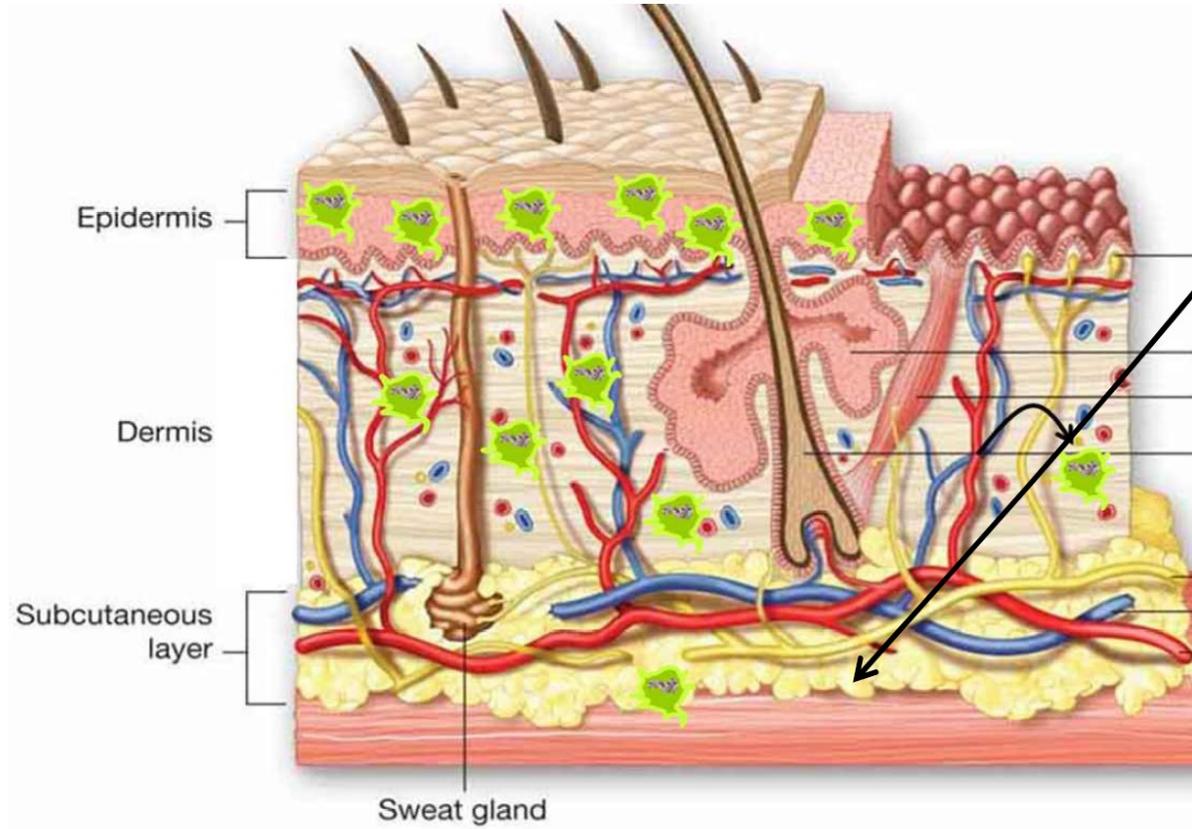
Aber: i.d. funktioniert nicht immer gut. Bestimmte Vektorimpfstoffe funktionieren nur i.m. Es muss also getestet werden

Intradermale Applikationstechnologien



Hettinga et al., *Vaccines*, 8, 534;
doi:10.3390/vaccines8030534

Wo sind die Hauptakteure
lokalisiert?



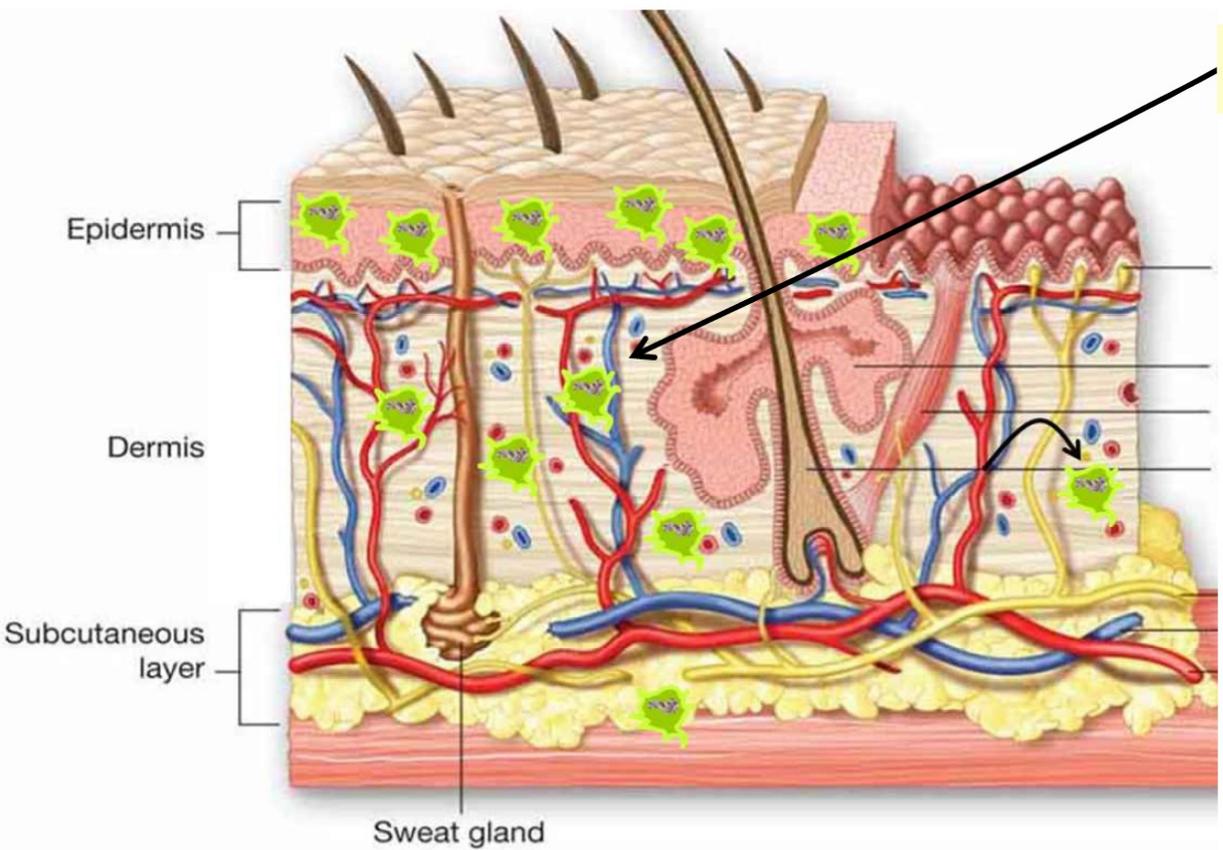
?



Wo sind die Hauptakteure
lokalisiert?



... da müssen wir unser Antigen «verkaufen»...



1. Grundlagen des Immunitätsaufbaus gegen Viren und Bakterien
 1. Angeborene Immunität
 2. Erworbene Immunität
 3. Schleimhautimmunität
2. Funktionsweise von antiviralen und antibakteriellen Impfstoffen
3. Intradermale, subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikation
4. Schlussfolgerungen für die *Lawsonia intracellularis* intradermale Impfung

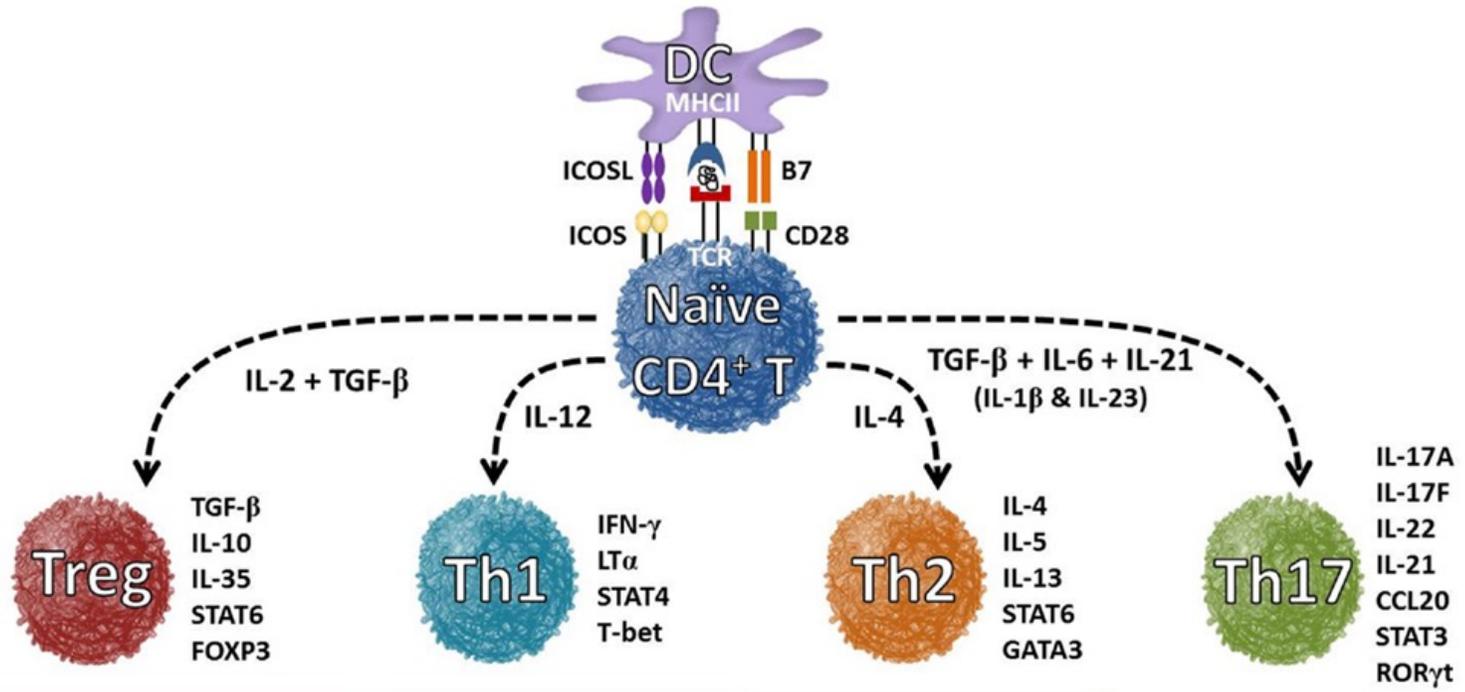
Lawsonia intracellularis fact sheet

1. **Intrazelluläre** gram- Bakterien verursacht proliferative Enteropathie
2. Chronische Entzündliche Darmerkrankung mit dysregulierter Proliferation von Enterozyten → Darmwandverdickung und Aufnahmestörung
3. In der Anfangsphase auffallend schwache Entzündung und verzögerte Immunantwort.
4. Aber: Infektion verursacht Immunität gegen Reinfektion (keine klinische Erkrankung, starke Reduktion bakterieller Ausscheidung)
5. Lebend-attenuierte Impfstoffe haben eine schützende Wirkung nach oraler Applikation
6. Inaktivierte Impfstoffe schützen nach i.m. und auch i.d. Applikation

Mögliche schützende adaptive Immunantwort gegen Lawsonia

Nach Lehrbuch wünschenswert	Bisher gemessen, untersucht
1. IgM, IgG und mucosal IgA Antikörper:	✓
Neutralisation,	✓
Opsonierung,	?
Komplementaktivierung	?
Helfer T-Zellen (CD4) → IFN-γ	✓
▶ Makrophagenaktivierung → Abtöten phagozytierter Bakterien	?
Zytotoxische T-Zellen (CD8)	?
▶ Lyse infizierter Zellen	

Ideale Helfer T-Zellantwort gegen Lawsonia



Regulatorische T-Zelle
Immunregulation, Homöostase

Th1-Zelle
Viren und intrazelluläre Bakterien wie Lawsonia, Listerien, Mykobakterien

Th2-Zelle
Würmer

Th17-Zelle
Extrazelluläre Bakterien wie E. coli, Staphylokokken, Pilze

?
unerwünscht

✓
erwünscht

?
unerwünscht

?
Wahrscheinlich
wünschenswert

I.d./i.m. Impfung kann keine sekretorische IgA's induzieren

aber

ermöglicht durch Induktion einer starken systemische Immunantwort eine passive Diffusion von Serumantikörper und auch Immigration von wenigen Helfer T-Zellen in den Darm.

Parenterale versus mukosale Impfstoffapplikation: Vor und Nachteile

Parenteral (i.m., s.c., i.d.)

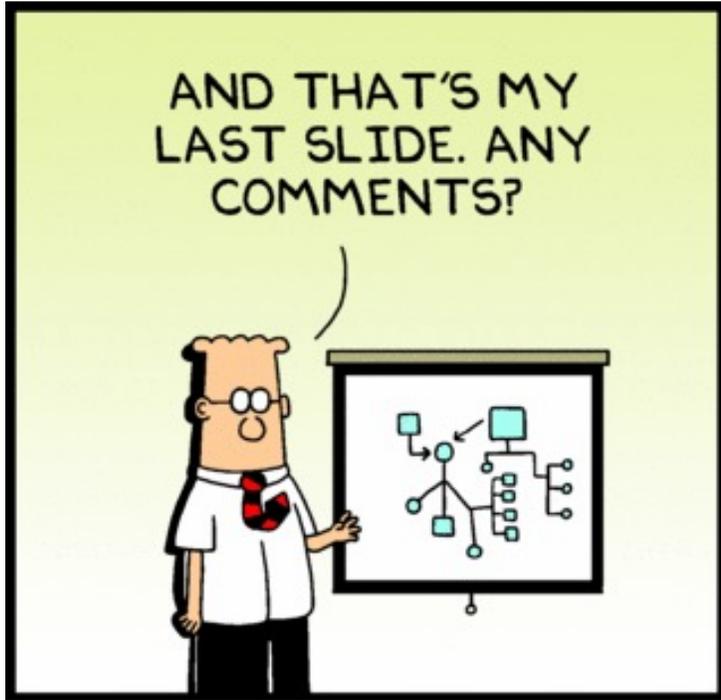
- Hohe Immunogenität
- Keine/schwache Induktion einer mukosalen Immunantwort
- Funktioniert mit sehr tiefen Antigendosen
- Hohe Reproduzierbarkeit
- Viele gute Adjuvanzien stehen zur Verfügung

Mukosal (Oral, nasal, aerogen...)

- Tiefe Immunogenität
- Induktion einer mukosalen Immunantwort und damit Verhinderung der Pathogeninvasion
- Hohe Antigendosen bzw. relative schwache Attenuierung notwendig (Sicherheitsbedenken)
- Adjuvanzen müssen Schleimhautbarriere überwinden: Gefahr der lokalen Gewebsschädigung

Wasser = Schleimhautbarriere (Mukus und Epithel)





Dilbert.com DilbertCartoonist@gmail.com



12-7-11 © 2011 Scott Adams, Inc./Dist. by Universal Uclick

